



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA NO
SEMIÁRIDO**

Evandro Santos Amanso

**Enzima superóxido dismutase em isolados de *Corynebacterium
pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes**

Petrolina – PE
2015

Evandro Santos Amanso

Enzima superóxido dismutase em isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária no Semiárido.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina - PE
2015

Amanso, Evandro Santos.

A484e Enzima superóxido dismutase em isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes / Evandro Santos Amanso. – Petrolina, 2015.

60 f.: il.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.

1. Caprino. 2. Ovino. 3. Patogenicidade. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 636.3

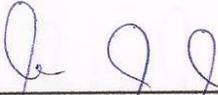
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA NO
SEMIÁRIDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

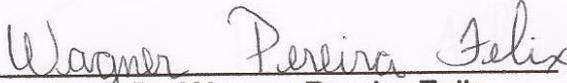
Evandro Santos Amanso

**Enzima superóxido dismutase em isolados de
Corynebacterium pseudotuberculosis obtidos de pequenos
ruminantes**

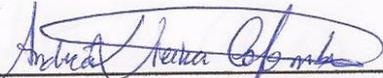
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em
**Ciência Veterinária no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São
Francisco.**



Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco



Prof. Dr. Wagner Pereira Felix
Universidade Federal do Vale do São Francisco



Profa. Dra. Andrea Vieira Colombo
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina, 03 de novembro de 2015.

Dedicatória:

A minha família...

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pois sem ele não conseguimos viver.

Ao Professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota, por me aceitar para orientar.

Ao Professor Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pois é um grande exemplo profissional, tenho muito a agradecer ao senhor, por todo esse tempo de aprendizado, sou muito grato por tudo.

A Professora Dr. Gisele Veneroni, uma pessoa muito competente e profissional, também sou muito grato pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. João José, por poder contar sempre com sua ajuda, obrigado professor.

Ao Professor Dr. Wagner Félix, o quanto sou grato ao senhor, pois o senhor também é um grande profissional e amigo. Foi através do senhor que conseguir desenvolver a pesquisa desse experimento.

A Yasmin, Adijailson e Matheus Lima, vou ser sempre grato a vocês, pois deram uma grande contribuição para o experimento.

A minha mãe e ao meu pai que me dão forças para lutar e conseguir realizar os meus ideais.

A minha Irmã e minha sobrinha por todo carinho que me dá.

A todos meus familiares, em especial a minha tia Maria José, por todo apoio que me dão.

A todos os meus afilhados (Aryel, Magno, Ingrid e Samira) por todo carinho.

A todos do Laboratório de Bioquímica, amigos essenciais no desenvolvimento da pesquisa, Alexandre, Deise, Cárita, Carla, Rebeca, Willian, Márcia, vou ser sempre grato a vocês, mais o grupo de amigo conquistei.

A todos do Laboratório de Microbiologia e imunologia Animal, por toda amizade conquistada e juntos contribuindo para pesquisa, uma segunda família que conquistei desde da graduação.

A Pós graduação Ciências Veterinária no Semiárido, por me deixar fazer parte desse grupo e conquistar mais uma etapa na minha carreira profissional.

A todos meus amigos que sempre estão torcendo por mim.

A todos os meus irmão em Deus da Paróquia Sagrada Família, que sempre me dão forças para lutar.

Epígrafe:

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se
lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas que estão amplamente distribuídas em diversos organismos, tanto eucarióticos, como procarióticos, contribuindo com a defesa celular frente a espécies reativas de oxigênio, mediadas pelo radical superóxido, subproduto do metabolismo oxidativo. As SODs são classificadas em quatro grupos, CuZnSOD; MnSOD; NiSOD e FeSOD, dependendo do cofator metálico ligado a enzima. As SODs estão presentes em vários processos patogênicos, como adesão e sinalização celular, bem como na resistência intracelular nos macrófagos. Com isso, esse estudo teve como objetivo detectar a presença da enzima SOD em isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes com linfadenite caseosa, como também, caracterizar o *gene sodA* e *sodC* codificantes da MnSOD e CuZnSOD, respectivamente. Foram utilizados 30 isolados de *C. pseudotuberculosis* obtido de casos Linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, sendo que dessas amostras, foram extraídas proteínas totais, as quais foram analisadas pelas técnicas de Bradford e SDS-PAGE para confirmar o sucesso da extração. Para detectar a enzima superóxido dismutase, foi utilizada eletroforese em gel de atividade, corado com NBT (azul de nitrotetrazólio). Os isolados foram submetido a PCR (Reação em cadeia da Polimerase) para verificação do *gene sodA* e *sodC*. A maior concentração de proteína obtida após a extração proteica nos isolados foi de 3,4 mg.mL⁻¹, sendo que dos 30 isolados estudados, nove apresentaram apenas uma banda visível no gel, sendo que cinco foram classificados como MnSOD e quatro como CuZnSOD. Dos isolados estudados, quatro amostras apresentaram mais de uma banda, podendo classificar as mesmas em MnSOD e CuZnSOD simultaneamente. Na amplificação por PCR todos isolados testados apresentaram resultados positivos para o *gene sodA* e *sodC*. Estes resultados apontam para uma maior sensibilidade da detecção genética do que da avaliação proteica para a presença da enzima e isto pode estar associada a dificuldade no processo de extração destas proteínas nos isolados. De toda maneira, os resultados obtidos em conjunto identificam a presença da enzima superóxido dismutase em isolados de *C. pseudotuberculosis* em pequenos ruminantes, bem como, a presença dos genes *sodC* e *sodA*, classificando respectivamente a CuZnSOD e MnSOD. São necessários mais estudos em relação a SOD em *C. pseudotuberculosis* a fim de caracterizar seu papel na patogenicidade do micro-organismo.

Palavras chaves: caprino-ovinocultura, semiárido, virulência

ABSTRACT

Superoxide dismutase (SOD) are metalloenzymes that are widely distributed in several organisms, both eukaryotic and prokaryotic, contributing with the cellular protection against reactive oxygen species which are mediated by superoxide radical, the byproduct of oxidative metabolism. SOD's are classified into four groups, according to the metal cofactor linked to enzyme: CuZnSOD, MnSOD, NiSOD and FeSOD. They are present in various pathogenic processes such as cell adhesion and signalization, as well as in the intracellular resistance into macrophages. This study aimed to detect the presence of SOD in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from small ruminants with caseous lymphadenitis and characterize the *sodA* and *sodC* genes responsible for coding MnSOD and CuZnSOD, respectively. Total proteins were extracted, which were analysed by Bradford and SDS-PAGE techniques to confirm successful extraction. In addition, activity gel stained with NBT (Nitroblue Tetrazolium) was used to detect superoxide dismutase enzyme. The isolates were also submitted to PCR (Polymerase chain reaction) to verify the *sodA* and *sodC* genes. The highest concentration of protein obtained after the protein extraction was 3,4 mg.mL⁻¹, and nine of the thirty isolates studied showed just one visible protein band on gel wherein five were classified as MnSOD and four as CuZnSOD. From the isolates studied, four samples showed more than one protein band, which may classify as MnSOD and CuZnSOD simultaneously. Furthermore, in the amplification by PCR all isolates tested demonstrated positive results to *sodA* and *sodC* genes. These results show that genetic detection has a greater sensibility than protein evaluation to the presence of the enzyme and it may be associated to difficulty in the extraction process these proteins in the isolates. Nevertheless, the results obtained identify the presence of superoxide dismutase enzyme in *C. pseudotuberculosis* isolated from small ruminants, as well as the presence of *sodA* and *sodC* genes, classifying as CuZnSOD and MnSOD, respectively. Indeed, further studies are necessary regarding SOD in *C. pseudotuberculosis* in order to characterize its role in pathogenicity of the microorganism.

Key words: goat and sheep industry, semi-arid, virulence

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 da F0/60 do isolado Coryne OVI CCA de *C. pseudotuberculosis*37
- Figura 2: Cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 da F0/60 do isolado Coryne OVIOS01 de *C. pseudotuberculosis*38
- Figura 3: Cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 F0/60 do isolado Coryne CAPM 01 de *C. pseudotuberculosis*38
- Figura 4: SDS-PAGE de proteína do extrato bruto (EB) e Fração (F0/60) dos isolados de *C. pseudotuberculosis* corado com prata. A: EB do isolado Coryne OVI1FL; B: EB do isolado coryne OVIOS01; C: F0/60 do isolado Coryne OVIOS01; D. F0/60 do isolado Coryne OVI1FL; E: F0/60 do isolado Coryne cap2FL; F: EB do isolado Coryne cap2FL e G: EB do isolado Coryne OVICCA.....39
- Figura 5: Análise eletroforético da atividade de SOD em gel nativo corado com NBT. Gel com bandas únicas em amostras representativas de isolados de *C. pseudotuberculosis*. M: marcador CuZnSOD (Sigma); 1: Coryne OVICCA; 6: Coryne OVI1FL; 18 Coryne cap1C; 51: Coryne OVID04 e 53: Coryne OVIZ02.....40
- Figura 6: Análise eletroforético da atividade de SOD em gel nativo corado com NBT. Gel com várias bandas em altura diferente em amostras representativas de isolados de *C. pseudotuberculosis*. M: marcador CuZnSOD (Sigma); 3: Coryne OVI79PV; 10 Coryne cap.....41
- Figura 7: Gel corado com NBT mostrando bandas do PI das amostras 1: Coryne OVI CCA; 2:Coryne OVIOS01 ; 3: Coryne CAPM01 e M: marcador CuZnSOD (Sigma) das amostras após a cromatografia de troca iônica.41
- Figura 8: Análise eletroforética da atividade de SOD, corado com NBT. M: controle positivo CuZnSOD (Sigma); EB: extrato bruto de proteína *C. pseudotuberculosis* (Coryne CAPGE03).....42

Figura 9: Análise eletroforético da atividade de SOD. Gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidor; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H₂O₂, inibido com 10 mM de H₂O₂, em extrato bruto de proteína de *C. pseudotuberculosis* (Coryne ovi1FL).....42

Figura 10: Análise eletroforético da atividade de SOD em gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidores; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H₂O₂, inibido com 10 mM de H₂O₂, em extrato bruto de proteína *C. pseudotuberculosis* (Coryne ovi79PV).....43

Figura 11: Produto da PCR do gene *sodC* em *C. pseudotuberculosis*, sendo que M: marcador molecular e 1 a 15 amostras representativas de DNA de *C. pseudotuberculosis*.....44

Figura 12: Produto da PCR do gene *sodA* em *C. pseudotuberculosis*, sendo que M: marcador molecular e 1 a 15 amostras representativas de DNA de *C. pseudotuberculosis*.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos indicadores utilizados para detecção dos genes <i>sodA</i> e <i>sodC</i>	33
Tabela 2: Condições da reações de PCR para os genes <i>sodA</i> e <i>sodC</i>	34
Tabela 3: identificação das cepas bacterianas de <i>C. pseudotuberculosis</i> quantificação de proteínas (mg. ml ⁻¹)	36
Tabela 4: Concentração de proteína após fracionamento F0/60 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LC	Linfadenite caseosa
PE	Pernambuco
BA	Bahia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PLD	Fosfolipase D
<i>fagA</i>	Proteína Integral de Membrana
<i>fagB</i>	Transportador de enterobactina de ferro
<i>fagC</i>	ATP-proteína de ligação da membrana
<i>fagD</i>	Sideróforos –proteína de ligação de ferro
PAI	Ilhas de Patogenicidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucléico
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
PB	par de bases
UV	Ultravioleta
KCl	Cloreto de potássio
Mg ₂	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
pH	Potencial hidrogeniônico
BHI	Brain Heart Infusion Broth
DO	Densidade Óptica
SOD	Superóxido dismutase
NBT	Azul de nitrotetrazólio
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
CuZnSOD	Cobre e zinco superóxido dismutase
EROs	Espécies reativa a oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
FeSOD	Ferro superóxido dismutase

NiSOD	Níquel superóxido dismutase
BSA	Albumina sérica bovina
PBS	Tampão fosfato salino
rpm	Rotação por minuto
PI	Primeiro pico
PII	Segundo pico
P0/60	Fração originada da precipitação com 60% de sulfato de amônia
NaCl	Cloreto de sódio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N'' - tetrametil etilenediametilamina
PSA	Persulfato de amônio
EB	Extrato bruto
DEAE	Dietilaminoetil

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
M	mol
KHz	Quilohertz
G	grama
pH	Potencial hidrogeniônico
min	Minuto
mA	Amperagem
V	Volts
U	Unidade de atividade enzimática
mg	Miligrama
mL	Mililitro

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
LISTA DE SIMBOLOS.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. Importância econômica da caprino-ovinocultura no Brasil e na Região Nordeste.....	19
2.2. Linfadenite caseosa.....	20
2.2.1. Sinais clínicos.....	22
2.2.2. Patogenia.....	23
2.2.3. Fatores de virulência.....	24
2.3. Superóxido dismutase (EC1.15.1.1).....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Local de execução do experimento.....	29
3.2. Amostras bacterianas.....	29
3.3. Extração de proteína do <i>C. pseudotuberculosis</i>	29
3.4. Quantificação de proteínas.....	30
3.5. Precipitação com sulfato de amônia.....	30
3.6. Diálise.....	31
3.7. Cromatografia em resina de troca iônica.....	31
3.8. Eletroforese de proteína em gel desnaturante (SDS-PAGE)	31
3.9. Eletroforese em gel nativo para detecção da atividade de SOD.....	32
4.0. Caracterização molecular	32
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Resultados da Caracterização molecular	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	49

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8. ANEXOS	57
8.1. ANEXO A	57
8.2. ANEXO B	58
8.3. ANEXO C	59
8.4. ANEXO D	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

A caprino-ovinocultura é uma atividade explorada em diversos países, destacando-se principalmente em países com regiões semiáridas. Os caprinos e ovinos são considerados animais rústicos e bem adaptados a este tipo de clima, apresentando desempenho produtivo em locais com baixas condições de sobrevivência. (SAMPAIO et al., 2009).

O Brasil apresenta 9.379 milhões de cabeças de caprinos e 17.662 milhões de cabeças de ovinos, sendo que na produção de caprinos os Estados que apresentam maior destaque são: Bahia 29,2%, seguido por Pernambuco, com 20,5%, e Piauí, com 14,7%. Os municípios com maiores efetivos pela ordem são: Casa Nova (BA), Floresta (PE) e Sertânia (PE). Juazeiro apresenta uma queda na produção reduzindo duas posições no respectivo ano. Na produção de ovinos, o Estado do Rio Grande do Sul detém 22,6% do rebanho nacional, sendo o mais representativo. Na sequência, o Estado da Bahia com 17,4% e o Ceará com 12,1% (IBGE, 2011).

Entretanto, apesar do tamanho dos rebanhos nessa região, a sua produtividade apresenta um declínio, devido a vários fatores, como: irregularidades das chuvas, que afeta a oferta de alimentos e conseqüentemente maximiza a taxa de mortalidade. Outro fator importante que pode afetar a produtividade dos caprinos e ovinos é a falta de implantação de tecnologias pelos produtores. Porém, é necessário melhorias nos sistemas de criação dos pequenos ruminantes, devido ao aumento na demanda de carne e leite pelo o mercado consumidor (PEDROSA et al., 2003).

O manejo sanitário inadequado desencadeia várias enfermidades, que são citadas como responsáveis pela redução de produtividade no rebanho de pequenos ruminantes, dentre elas destaca-se a linfadenite caseosa (LC) (Ribeiro et al., 1988). A LC é uma enfermidade bacteriana que afeta os caprinos e ovinos, assim como outras espécies de animais. O contato direto com fômites e materiais purulentos drenados de abscessos são as principais fontes de infecção da doença. A incisão e a antissepsia dos abscessos são as formas de tratamento de maior frequência e utilização (ALVES et al., 2008).

O *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente patológico da LC, sendo uma bactéria intracelular facultativa, (DORELLA et al., 2006; BAIRD e FONTAIME, 2007). O *Mycobacterium tuberculosis* apresenta semelhança com o patógeno anterior, devido à capacidade de ambos se multiplicarem no interior de macrófagos ocasionando infecções clínicas persistentes (LIAO et al., 2013).

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema mononuclear fagocítico com capacidade de produzir reativos de nitrogênio e de oxigênio e enzimas lisossomais, cuja principal função é de desenvolver uma resposta antimicrobiana contra os micro-organismos ingeridos (NATHAN et al., 2000). Baseado nisso, várias bactérias patogênicas desencadeiam mecanismos de proteção contra estes reativos de nitrogênio e oxigênio que apresentam atividade antimicrobiana potente (ZAHRT et al., 2002).

A Superóxido dismutase (SOD) é uma classe de metaloenzimas encontradas em organismos aeróbicos, tanto em procariontes como eucariontes. Pois, devido ao estresse oxidativo que é prejudicial para as células, a SOD é responsável em catalisar reações, convertendo o íon superóxido em moléculas de O_2 e H_2O_2 . Desta forma, a presença da SOD em agentes patogênicos pode ser um fator que contribui com a virulência dos mesmos (SEYLER et al., 2001; FANG et al., 1999).

Estudo realizado em bactéria observou-se a presença de dois tipos SOD diferentes de acordo com a localização. A cobre e zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) que é codificado pelo gene *sodC* localizado no DNA de célula bacteriana, e o manganês superóxido dismutase (MnSOD), presente em células procariontes e eucariontes, sendo que, em procariontes o gene que codifica MnSOD é o gene *sodA* (BAFANA et al., 2011).

Andrus et al., (2003) menciona que a presença do gene *sodA* é essencial para o crescimento aeróbico de *Streptococcus thermophilus* auxiliando no tratamento de estresse oxidativo encontrado pelo organismo em crescimento sob condições normais.

Diversos fatores desencadeiam a virulência do *C. pseudotuberculosis*, sendo que a enzima superóxido dismutase pode ser um dos fatores de virulência, contribui com a permanência do patógeno dentro do macrófago no hospedeiro. Com isso, o trabalho teve como objetivo detectar a presença da enzima superóxido dismutase, bem como, caracterizar o gene *sodA* e *sodC*, identificando o MnSOD e CuZnSOD, respectivamente.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância econômica da caprino-ovinocultura no Brasil e na Região Nordeste

No Brasil, a caprino-ovinocultura é considerada uma atividade econômica de grande potencial para o desenvolvimento do agronegócio brasileiro, devido à grande produção de carne, leite e lã, que cada vez mais são adquiridos pelo mercado consumidor de todo o país. A produção de carne e de pele caprina apresenta grande destaque no nosso país, sendo os principais produtos comercializados (SAMPAIO et.al., 2009).

A caprino-ovinocultura é apresentada como um potencial socioeconômico para o agronegócio mundial, apesar de que necessita incrementar ações para esse setor. Com isso, é necessário moldar a cadeia de produção, desde as propriedades até o consumidor, pois o mercado está cada vez mais exigente com a qualidade de produtos de origem animal (BANDEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2008).

Em relação ao manejo nas propriedades são utilizados dois diferentes sistemas de produção. Os grandes produtores que utilizam tecnologia para otimização no manejo genético, sanitário, e reprodutivo dos rebanhos, e consequente aumento na produtividade. No entanto, o destaque maior permanece ainda a pecuária de subsistência, na qual não existe um manejo tecnificado adequado (PINHEIRO et al., 2000). Desta forma, no Nordeste brasileiro, a linfadenite caseosa é uma das enfermidades contagiosas, que ocasiona uma redução na produtividade (ANDRADE et al., 2012).

2.2. Linfadenite Caseosa

A Linfadenite Caseosa isoladamente ou em conjunto com outros problemas sanitários de pequenos ruminantes, contribui consideravelmente para redução da qualidade do leite, carne e pele, levando a perdas financeiras e inviabilizando o empreendimento (JÚNIOR et al., 2006).

No Reino Unido, a enfermidade foi descrita pela primeira vez no ano de 1990. Nesta época, a propagação da infecção em ovinos e caprinos levou grande preocupação entre os agricultores e veterinários. No entanto, na Austrália e Nova Zelândia esta infecção apresenta características diferentes, com índice de prevalência menor, devido a prática de inspeção de carne nas indústrias e de adoção de medidas gerais de controle (BAIRD e FONTAINE, 2007).

Nos abatedouros, os principais prejuízos citados estão associados a condenação das carcaças de caprinos e ovinos, bem como danos provocados à pele. Esta enfermidade também pode ser relacionada com problemas de saúde pública (NOZAKI et al., 2000). Linfadenite Caseosa (LC), conhecida também por mal do caroço ou pseudotuberculose, é uma doença infecto-contagiosa de caráter crônico que acomete, principalmente, caprinos e ovinos. O agente etiológico da LC é o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, classificado como uma bactéria Gram-positiva, não esporulada, aeróbica e parasita intracelular facultativa de macrófagos (BAIRD e FONTAINE, 2007), caracterizada como pleomórfica, pequena, com formato cocóide, de clavias ou bacilos (morfologia corineforme). Em esfregaços corados, as células tem formato de “letras chinesas” (QUINN et al., 2005).

Esta bactéria é responsável por sintetizar uma exotoxina denominada de fosfolipase D, que atua como esfingomielinase, com ação hemolítica e dermonecrótica, ocasionando supuração nas células endoteliais e consequentemente aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e linfáticos, proporcionando a invasão de outras bactérias patogênicas. Além disso, o *C. pseudotuberculosis* possui lipídeos em sua parede celular com atividade leucotóxica, conferindo proteção bacteriana contra fagocitose (ALVES et al., 2007, FONTAINE e BAIRD, 2008).

Corynebacterium é um gênero agrupado na classe das actinobactérias, que também reúne os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Estes apresentam características semelhantes como: organização da parede celular, que

tem um grande complexo polimérico de peptideoglicano, arabinogalactano e o ácido micólico (DORELLA et al., 2006).

As infecções causadas pelo *C. pseudotuberculosis* não são descritas apenas em caprinos e ovinos, podendo ocorrer na linfangite ulcerativa em equinos, abscesso superficiais em bovinos, suínos e cervos. Em búfalos, camelos, porco espinhos e lhamas, o patógeno já foi isolado. (DORELLA et al., 2006). Em humanos, o *C. pseudotuberculosis* tem um baixo poder zoonótico, mas podem ocorrer contaminações, devido às atividades ocupacionais (LIU et al., 2005). Em uma menina francesa de 12 anos, foi isolado o *C. pseudotuberculosis* do linfonodo inguinal caracterizado por linfadenite necrosante (TROST et al., 2010).

Criadores de caprinos e ovinos do semiárido brasileiro enfrentam um grande problema no aspecto sanitário dos rebanhos quanto à alta incidência e prevalência da LC (COELHO et al., 2011). Estudo realizado por Sá et al., (2013) relata a alta prevalência de LC nas propriedades de caprinos e ovinos, assim como nos animais abatidos em abatedouros nas cidades de Petrolina-PE e Juazeiro-BA. Neste trabalho, 75% das amostras coletadas de animais com suspeita da doença foram positivos para pesquisa de *C. pseudotuberculosis*.

Um dos fatores que não constitui um fator de risco para infecção por *C. pseudotuberculosis*, mas que pode contribuir para o surgimento da LC no plantel, é a raça. Animais de pêlo curto, como os da raça Santa Inês, são mais suscetíveis em contrair a doença, devido a fatores mecânicos, como lesões causadas pela vegetação seca ou espinhosa, que é comum em períodos de seca, e através do manejo dentro das instalações. Os animais lanados apresentam menor risco devido à proteção que a lã constitui sobre a pele. (GUIMARÃES et al., 2009).

Estudo realizado por Souza et al., (2011) relata que a maior prevalência da doença é observada em fêmeas (17,9%) do que em machos (13,8%), provavelmente, devido a maior idade de abate das fêmeas, que permanecem por mais tempo nas fazendas do que os machos. Ainda neste estudo, no exame *post mortem*, o linfonodo que apresentou o maior número de lesões foi o pré-escapular, com 97 (36,3%) do total de 268 lesões encontradas, seguido do linfonodo parotídeo com 60 (22,4%) e o linfonodo pré-crural com 56 (20,9%).

2.2.1 Sinais Clínicos

A linfadenite caseosa pode se apresentar de duas formas, externa (cutânea e superficial) e interna (vísceras) dos animais. Sendo que a forma externa é caracterizada por apresentar linfonodos palpáveis, que ao longo do tempo ocorre perda de pêlo e conseqüentemente ruptura (BAIRD e FONTAIME, 2007). Esses abscessos são caracterizados morfológicamente por apresentar camadas alternadas e concêntricas de tecido fibroso, como material purulento com consistência pastosa (CAMPOS, 2005).

Clinicamente, os animais afetados apresentam abscessos caseosos nos linfonodos mamários, parotídicos, retro-faríngicos, subilíacos, cervicais superficiais e mandibulares. De acordo com a gravidade da doença, a bactéria não se localiza apenas nos linfonodos superficiais, podendo infectar outros órgãos, através da via linfo-hemática, ocasionando piotórax, pneumonia e linfadenite pré-hepática, mesentérica e mediastínica (NOZAKI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2011; JÚNIOR et al., 2006).

Júnior et al. (2006) demonstram que o *C. pseudotuberculosis* pode ocasionar também mastite clínica, uma vez que as lesões caseosas podem surgir nos linfonodos supra mamários. Além disso, a bactéria pode ser disseminada nos rebanhos através da reprodução, já foi visto que a mesma pode ser isolada em sêmen de reprodutores ovinos infectados (CAMARGO et al., 2010).

2.2.2 Patogenia

C. pseudotuberculosis ao penetrar no organismo é fagocitado pelos macrófagos, e dentro deles ocorre o processo de destruição do patógeno através da ação do fagolisossoma. No entanto, esta bactéria é capaz de sobreviver a esse processo, e conseqüentemente, multiplica-se dentro dos macrófagos, ocasionando a morte dos mesmos. Esse mecanismo de resistência está correlacionado com a camada lipídica externa da parede celular presente nesta bactéria e a resistência da mesma ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos (DORELLA et al., 2006; BAIRD e FOTAINE, 2007).

Após a infecção inicial do *C. pseudotuberculosis*, através da penetração de mucosas ocular, oral e nasal, ou por contato com ferimentos de pele contaminada, o micro-organismo propaga-se rapidamente para os linfonodos de drenagem local. Nestes locais formam-se vários piogranulomas que se desenvolvem formando abscessos, que muitas vezes através do sangue ou do sistema linfático pode formar abscesso em órgãos (coração, fígado, rins, glândula mamária, medula espinhal e testículos) levando a formação de linfadenite crônica, sendo lesões pulmonares uma das principais fontes de contaminação crônica no rebanho (BAIRD e FOTAINE, 2007).

Dentro dos abscessos, as bactérias conseguem permanecer vários anos após a infecção inicial e depois podem ressurgir ocasionando novamente a doença. A bactéria permanecer em um estado de dormência no hospedeiro, e ao passar do tempo, pode ocorrer a reativação da doença em novos locais no animal. (BAIRD e FOTAINE, 2008).

Quando o micro-organismo estabelece a infecção no hospedeiro infectado, gradualmente ocorre a formação de abscessos nos nódulos linfáticos, os quais se rompem, para disseminar o conteúdo produzido. Inicialmente, o pus produzido é coloidal, mas ao passar do tempo esse material torna-se sólido, devido aos nódulos de mineralização, que muitas vezes são laminados, formando camadas concêntricas (BAIRD e FOTAINE, 2008).

2.2.3 Fatores de virulência

A capacidade de um micro-organismo em causar doença é denominada de patogenicidade. Micro-organismos patogênicos se diferenciam de outros da mesma espécie, pelo fato de ter e expressarem genes que codificam fatores de virulência, ou seja, fator que coloniza e modifica a fisiologia do hospedeiro (VIEIRA, 2009).

O mecanismo de virulência do *C. pseudotuberculosis* não é totalmente compreendido, devido aos poucos estudos realizados. No entanto, sabe-se que a fosfolipase D é um dos fatores de virulência presente nesta bactéria (BAIRD e FONTAINE, 2007). Esta é uma enzima, exotoxina ou citotoxina, com habilidade de hidrolisar a esfingomielina, que desfalece as membranas celulares favorecendo a infecção pelo micro-organismo, como também ocasiona hemólise em meios ágar sangue, sintetizado com eritrócitos de ovinos (QUINN et al., 1994).

A fosfolipase D (pld) (EC. 3.1.4.4), aumenta a permeabilidade vascular e constitui um fator piogênico estável que atrai leucócitos (DORELLA et al., 2006). A exotoxina fosfolipase D ocasiona hidrólise nas ligações éster da esfingomielina em membranas celulares de mamíferos e contribui para a propagação da bactéria a partir do local inicial, onde ocasiona uma inflamação local, atingindo os linfonodos regionais e formação de abscessos (TROST et al., 2010; DORELLA et al., 2006).

Na parede celular destas bactérias encontram-se lipídios associados, como o ácido micólico, que também está presente em *Mycobacterium tuberculosis*, contudo o *C. pseudotuberculosis* não se apresenta como álcool-ácido resistente (COSTA, 2002). Além disso, na parede celular do *C. pseudotuberculosis* pode-se encontrar lipídeos que promovem proteção bacteriana contra enzimas degradáveis presente em fagolisossomos de células como macrófagos, como também, favorecem a aderência do patógeno desencadeando um processo de citotoxicidade local (RADOSTITS et al., 2002). A camada lipídica presente na parede celular é um dos fatores que contribui para a permanência prolongada da bacteriana no meio ambiente (BAIRD e FONTAINE, 2007).

Ruiz et al., (2011) mencionam que um mecanismo favorável para identificação de fatores de virulência em bactéria são as ilhas de patogenicidade (PAI), na qual contribui para o aumento da virulência, uma vez que codificam mecanismos de invasão, adesão, proliferação e colonização no hospedeiro, minimizando as funções do sistema imunológico. Um outro fator indicativo que aumenta adaptabilidade de

bactérias em diferentes hospedeiros é a transmissão horizontal, que pode ocorrer através das ilhas de patogenicidade entre bactérias, contribuindo para descoberta de genes com funções associadas à absorção de ferro, magnésio e carbono, maximizando a sobrevivência em condições de estresse (RUIZ et al., 2011). Outro fator de virulência importante é o operon que codifica os genes *fagA*, *fagB*, *fagC* e *fagD* que são responsáveis pela absorção de ferro bacteriano. Estes genes não são bem expressos *in vitro*, contudo *in vivo* contribuem com a virulência da *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002).

O Projeto Genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica identificou sete fatores sigma nesta bactéria: fatores sigma B, C, D, E, H, K e M (PACHECO, 2010). Sendo, que os fatores sigma bacterianos são definidos como reguladores transcricionais, que se caracterizam por ser uma classe de proteínas dissociáveis do cerne da RNA polimerase bacteriana (MOONEY et al., 2005). Pacheco et al.,(2012) demonstram que o fator sigma E é responsável pela resistência da *C. pseudotuberculosis* à condições de estresse em ambiente intrafagossômico.

2.3 Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1)

Os micro-organismos invasores são neutralizados através de mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo que as principais substâncias antimicrobianas capazes de desencadear a proteção do hospedeiro são as espécies reativas de oxigênio (EROs) (HOLMBLAND, 1999). Quando essas EROs apresentam-se em baixa concentração, podem atuar como mecanismo benéfico para as células, através do processo de sinalização celular contra agentes infecciosos na qual o sistema de defesa promove a indução de resposta mitogênica. Já em alta concentração, as EROs levam a prejuízos celulares, devido ao estresse oxidativo, que modifica o DNA, proteínas, lípidios e carboidratos, danificando organelas, e conseqüentemente induzindo processos patológicos (VALKO et al., 2007).

Os radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes são parâmetros utilizados em estudos envolvendo mecanismos de patogenicidade, pois a presença de radicais livres de oxigênio, ou de oxigênio ativado em ambiente de estresse pode levar a degeneração das células (McCORD, 2000). Quando uma molécula apresenta um átomo de oxigênio, em estado altamente reativo, é considerada uma espécie reativa de oxigênio, com uma capacidade altamente oxidativa. Dentre as espécies oxidativas podem-se encontrar: Espécies radiculares (radicais livres), superóxido (O_2^-) e o H_2O_2 . Os radicais livres são moléculas que apresentam elétrons ímpares na órbita externa. Fora de seu nível orbital, esse elétron livre propicia a entrada de outro elétron de moléculas diferentes, tornando os radicais livres extremamente reativos. (McCORD, 2000; KOHEN e NYSKA, 2002).

As EROs são constituídas por todos radicais e não radicais derivados do oxigênio, que se apresentam eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, podendo ter o domínio de reagir com alto número de compostos que estejam vizinho. Estes possuem a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, e atuando como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005).

Antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais que neutralizam o excesso EROs, impedindo a danificação da estrutura celular. Os antioxidantes enzimáticas são compostos de superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, que também provoca redução do peróxido de hidrogênio à água e ao álcool (AGARWAL et al., 2005). Os

antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como ácido ascórbico, tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido α -lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001),

As superóxido dismutases (SOD) são enzimas antioxidantes, que catalisam a dismutação da superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a molécula de oxigênio, na presença de água, reduzindo, assim, os processos oxidativos destrutivos de EROs nas células. As SODs são classificadas em quatro grupos dependendo do tipo de metal, que são encontrados: SOD ferro (FeSOD), SOD níquel (NiSOD), SOD manganês (MnSOD) e SOD cobre/zinco (Cu/Zn SOD). Sendo que os dois maiores grupos de CuZn SOD e FeSOD, tiveram origens independentes, enquanto o FeSODs e MnSODs são produtos de duplicação gênica, sendo o FeSOD o ancestral (KUMARESON et al., 2015; BAFANA et al., 2011). A enzima FeSOD são encontradas em seres procariotos, bem como em plantas (CHENG et al., 2010). A enzima NiSOD são encontradas em *Streptomyces* spp., podendo estar presente também em Cianobactérias (WUERGEST et al., 2004). Fridovich, (1975, 1995) relata a presença da enzima MnSOD e CuZnSOD em diversos seres vivos, como: peixes, crustáceos e mamíferos. Em fungos da classe *Ascomycota*, a enzima encontrada foi MnSOD (FRÉALLE et al., 2006). A enzima CuZnSOD tem sido encontrada em diversas espécies bacterianas, como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Pausteuella mutocida* (KROLL et al., 1995). Wu et al. (1998) relatam a presença da enzima CuZnSOD em *M. tuberculosis*.

A superóxido-dismutase (SOD) é uma classe de metaloenzimas encontradas em organismos aeróbicos, presentes em células procarióticas e eucarióticas, protegendo ambas as células dos danos induzidos por estresse oxidativo. A SOD também pode ser um fator de virulência para muitos agentes bacterianos patogênicos (SEYLER et al., 2001; FANG et al., 1999). Segundo LIAO et al., (2013), as proteínas da SOD pode ajudar a *M. tuberculosis* a sobreviver dentro de macrófagos, provocando infecções clínicas persistentes.

A CuZnSOD presente na superfície das células de *M. tuberculosis* confere proteção contra a dismutação extracelular gerada por células do hospedeiro (PIDDINGTON et al., 2001). Esta enzima pode ser encontrada em fungos que são tolerantes ao estresse oxidativo extracelular, como os fungos entomopatogênicos (BITTENCOURT et al., 2004). A CuZnSOD está presente em bactérias, cloroplastos

e eucariotos. Nas células bacterianas, a enzima está localizada no periplasma e é codificada pelo gene *sodC*. A MnSOD é codificada pelo gene *sodA* em células procariotas (BAFANA et al., 2011). O gene *sodA* é responsável por codificar a enzima MnSOD que está presente em mitocôndrias em células eucariotas (GAUTIER et al., 2005). Segundo Andrus et al., (2003), a bactéria *Streptococcus thermophilus* apresenta o gene *sodA*, que é essencial para o seu crescimento em condições aeróbicas, mas na ausência deste gene os íons de manganês podem oferecer proteção parcial contra a toxicidade do oxigênio.

Piddington et al., (2001), comprovaram que isolados de *M. tuberculosis* contendo o gene *sodC*, ou seja, a enzima CuZnSOD, apresentam resistência contra produtos oxidativos produzidos pelos macrófagos. Na bactéria *Pasteurella multocida*, agente patogênico que ocasiona doenças em bovinos e bubalinos, os genes *sodA* e *sodC* também podem ser encontrados, sendo estes considerados fatores de virulência para os hospedeiros (VERMA et al., 2013).

Trost et al., (2010) relatam que a bactéria *C. pseudotuberculosis* FRC 41, isolado de humano com linfadenite necrosante, apresenta genes que codificam enzimas de proteção, provavelmente envolvidas com reações de desintoxicação, na qual, se encontram o manganês superóxido dismutase (*sodA*) e o cobre/zinco superóxido dismutase (*sodC*).

O aumento da compreensão do papel dos radicais livres em doenças está abrindo uma nova área para aplicação de antioxidantes na prevenção e na terapia de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Sendo, que diversos estudos vêm sugerindo que SOD pode contribuir com diversos tratamentos de enfermidades (BAFANA et al., 2011). Pesquisas realizadas com *Brucella abortus*, identificaram que Cu/ZnSOD é a enzima principal que pode contribuir para o desenvolvimento de vacina, colaborando com a prevenção da brucelose (RIVERS et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal e no Laboratório de Bioquímica do Campus Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-Pernambuco, Brasil.

3.2 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 30 isolados de *C. pseudotuberculosis* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal (Anexo A) para a extração das proteínas. Os isolados foram obtidos de abscessos de caprinos e ovinos provenientes de propriedades e de abatedouros das cidades de Petrolina-Pe e Juazeiro-Ba, sendo posteriormente identificados e caracterizados por Sá et al., (2013). As amostras bacterianas encontravam-se liofilizadas e estocadas a – 20°C e para a realização das análises, as mesmas foram cultivadas e mantidas em ágar sangue contendo 8% de sangue de ovino.

3.3 Extração de proteínas de *C. pseudotuberculosis*

Cada isolados bacterianos foram cultivados em 200 mL de BHI (*Brain Heart infusion*) e incubadas a 37 °C por 72 horas, sob agitação em shaker (150 rpm). As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm/15 minutos/25 °C), ressuspensas em 5 mL de água Mili-Q esteril e adicionado 3% de Tween-80 por 30 minutos. Em seguida, as células passaram por um processo de choque térmico, sendo mergulhadas no nitrogênio líquido por um minuto e depois em água na temperatura de 37°C até o descongelamento. Esse procedimento foi realizado por

três vezes com objetivo de romper a parede celular das bactérias. As células foram sonicadas cinco vezes, com uma frequência ultrassônica de 42 kHz por 60 segundos em cuba de ultrassom (Cristófoli). Durante este procedimento foi utilizado a metodologia adaptada segundo Bittencourt et al (2004), na qual, o tubo foi mantido em gelo. Após a sonificação, o extrato foi centrifugado (17.000xg/15 minutos/4°C) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C.

3.4 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em tubos de ensaios, porções de 2,5 mL do reagente Bradford foram misturadas a porções de 50 µL de cada amostra diluída e incubado à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as respectivas absorbâncias a 595nm foram determinadas em espectrofotômetro. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada para construção da curva padrão (Anexo B).

3.5 Precipitação com sulfato de amônia

O extrato bruto das três cepas bacterianas (Coryne ovi CCA; Coryne OVIOS01; Coryne CAPM01) foi fracionado com sulfato de amônia a 60% de saturação. Após 12 horas à temperatura ambiente, o precipitado foi separado por centrifugação (4.000 rpm por 40 minutos). O sedimento foi separado do sobrenadante e ressuspendida em água Mili-Q, resultando na fração 0/60%.

3.6 Diálise

As amostras foram dialisadas em uma membrana de celofane “cut-off: 14 kDa – SIGMA®” e estocadas em água destilada. As frações F0/60 foram dialisadas utilizando 20X o volume da fração de água destilada, sendo que essa água era trocada a cada duas horas, totalizando 4 trocas por diálise.

3.7 Cromatografia em resina de troca iônica (TI)

Após a diálise, as amostras foram aplicadas em uma coluna de 50 mL de troca iônica DEAE-SEPHADEX A-50 o volume aplicado na coluna foi de 3 mL. O tampão utilizado para retirada do primeiro pico (PI) foi o PBS 0,1 M pH 7,2 e para retirar o segundo pico (PII) foi adicionado NaCl 1M. O fluxo utilizado foi de 3 rpm/4,5 min e as frações coletadas foram 1,5 mL. Após a coleta das frações foram analisadas por absorvância em luz UV (280 nm) em espectrofotômetro (modelo UV mini 1240 – SHIMADZU) e as frações foram reunidas, dialisadas com H₂O e liofilizadas.

3.8 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida com condições desnaturantes (SDS-PAGE, 12%) das proteínas extraídas foi realizada segundo o método de Laemmli (1970), utilizando uma cuba de gel vertical e carregada em tampão 1X (7,5 mM de Tris, 60 mM de glicina e 0,02% de SDS) com voltagem constante de 250V e 50mA. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução corante de 0,1% de azul de Coomassie G-250; 40% de metanol e 10% de ácido acético, por uma hora e depois imerso em solução descorante de 40% de metanol e 10% de ácido acético, até o aparecimento das bandas.

3.9 Eletroforese em gel nativo para detecção da atividade de SOD

As amostras foram misturadas com 0,25 vol. de sacarose 80% e 0,1 vol. de 0,5% de azul de bromofenol e aplicadas em gel concentrador (2,5% de acrilamida/ 0,625% de bisacrilamida/ 7mM de TEMED/ 56 mM de Tris/ 0,5% PSA pH 6,8). A eletroforese foi efetuada mantendo a voltagem em 150V, em gel separador (8,5% de acrilamida/ 0,226% de bisacrilamida/ 7 mM de TEMED/ 325 mM Tris/ 0,3% PSA pH 8,8). O tampão de corrida utilizado foi preparado com 2,85 g.L⁻¹ de glicina e 0,47 g.L⁻¹ de Tris e pH 8,5.

Após a eletroforese, os géis foram corados e protegidos da luz, em uma solução de 2,45 mM de NBT (Azul de nitrotetrazólio) por 20 minutos, posteriormente mergulhados em uma solução de revelação por 15 minutos (36 mM de fosfato de potássio dibásico, 5,6 µM riboflavina, 28 mM de TEMED, pH 8,0) e exposto à fluxo luminoso: 4.4157 lúmens e intensidade: 6 500 K (branca) até o aparecimento das regiões acromáticas. Para classificar o tipo de superóxido dismutase foi utilizado KCN (Cianeto de potássio) e peróxido de hidrogênio ambos a 10 mM como inibidores (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

4.0 Caracterização molecular

Visando à tipificação dos isolados de *C. pseudotuberculosis* quanto à virulência, a presença dos genes que codificam *sodA* e *sodC* foi detectada através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores descritos na Tabela 1. A sequência dos iniciadores para amplificação dos genes *sodA* e *sodC* foram desenhados através do programa Primer3 Plus (Disponível em <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi>). A qualidade dos iniciadores foi verificada no site <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>, optando por primers com $\Delta G > 0$, evitando reações espontâneas e formação de hairpins.

A partir do DNA termo-extraído dos isolados bacterianos em água Mili-Q por Sá et al., (2013), estes foram adicionados a um mix (Tabela 2) e esta mistura foi

levada a um termociclador. A reação de amplificação para o gene *sod* resultou das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 50 segundos, temperatura de anelamento de 60°C por 50 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após o término dos ciclos houve uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em gel agarose 1,5% adicionado de brometo de etídeo, visualizados através de iluminação ultravioleta (UV) e documentado por meio do sistema de captura de imagem Kodak Digitalscience 1D.

Depois de realizada toda análise dos isolados estudados, foi selecionado uma amostra positiva para o gene *sodA* e *sodC* e enviado para uma empresa particular com intuito de realizar o sequenciamento. Os eletroferogramas obtidos foram analisados pelo programa PHRED para verificar a qualidade dos mesmos, e com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) contra a sequência do genoma completo (CP002097.1) foi confirmado o DNA dos genes (Anexo C).

Tabela 1. Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes *sodA* e *sodC*.

Gene	Sequência	Produto	Referência
<i>sodA</i> F	5'CTACATCGGCGTTGCTGTTA3'	411 pb	Esse trabalho
<i>sodA</i> R	5'GTGTTCAACTGGGAGGACGT3'		Esse trabalho
<i>sodC</i> F	5'CTGCGCCAAAAGTAGATCC3'	313 pb	Esse trabalho
<i>sodC</i> R	5'GATTGATTCTTGAGCTCGGC3'		Esse trabalho

Tabela 2. Condições de reação da PCR para os genes *sodA* e *sodC*.

Produtos da reação	Genes	
	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>
Tampão de enzima	1X(10mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM KCl)	
MgCl ₂ (mM)	1	1
dNTPs (mM)	0,3	0,3
<i>Primers</i> (μM)	0,3	0,3
<i>Taq</i> DNA polimerase (U)	2,5	2,5
DNA molde (μL)	3,0	3,0
Total (μL)	25	25

4. RESULTADOS

O protocolo utilizado para obtenção do extrato proteico bruto (EB) a partir dos isolados de *C. pseudotuberculosis* permitiu a obtenção de quantidades satisfatórias das proteínas, pois o tween-80 contribuiu para lise das células bacterianas. Na quantificação de proteínas foi utilizado a equação de curva padrão ($Y = 0,0056x + 0,0447$) do Bradford para cada isolado bacteriano, com o intuito de confirmar a qualidade da extração.

Os resultados obtidos na extração de proteínas de *C. pseudotuberculosis*, indicaram uma variação na quantidade de proteína (mg.mL^{-1}), sendo que 13/30 cepas estudadas apresentaram valores proteicos entre 0,85 e 3,4 mg.mL^{-1} . Em relação aos demais isolados, podemos perceber uma menor quantidade de proteínas, os quais variaram entre 0,16 e 0,70 mg.mL^{-1} . O isolado Coryne ovi79PV, abscesso na glândula mamária de um ovino apresentou a maior quantidade de proteína (3,4 mg.mL^{-1}), enquanto que o isolado Coryne Ovi1C obtido de linfonodo mandibular, foi obtida a menor quantidade de proteína (0,12 mg.mL^{-1}). A relação dos isolados e os valores de proteína obtidos em cada cepa bacteriana estão disponíveis na Tabela 3.

No intuito de concentrar a proteína, o EB da cepa Coryne ovi CCA; Coryne OVIOS01 e Coryne CAPM01 foram saturadas com sulfato de amônia obtendo a fração 0/60 (F0/60). Após a diálise foi realizada nova quantificação das proteínas, obtendo os resultados que estão na Tabela 4. No entanto, podemos observar que o valor de proteínas nas cepas saturadas foi menor em relação ao EB indicando que este procedimento não alcançou o objetivo pretendido.

Tabela 3. Identificação das cepas bacterianas de *C. pseudotuberculosis* e quantificação de proteína (mg.mL⁻¹).

Amostras	Espécie	Linfonodo	Proteína mg.mL⁻¹
Coryne ovi CCA	OVINA	MANDIBULAR	1,03
Coryne ovi79PV	OVINA	G.MAMÁRIA	3,4
Coryne ovi1FL	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR	1,9
Coryne cap2FL	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR	1,4
Coryne Ovi1C	OVINA	MANDIBULAR	1,2
Coryne Ovi2C	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR	0,16
Coryne Cap1C	CAPRINA	PAROTÍDEO	0,9
Coryne Cap3W	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR	0,19
Coryne Ovi1W	OVINA	G.MAMÁRIA	0,46
Coryne CR01	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR	0,19
Coryne CR07	CAPRINA	IGNAL	0,69
Coryne OVID02	OVINA	PAROTÍDEO	0,62
Coryne OVID04	OVINA	RETROFARINGEO	0,89
Coryne OVIZ02	OVINA	PAROTÍDEO	1,06
Coryne CAPGE03	CAPRINA	G.MAMÁRIA	1,60
Coryne OVIOS01	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR	1,01
Coryne OVIOS03	OVINA	PAROTÍDEO	0,85
Coryne CAPM01	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR	0,96
Coryne CAPM02	CAPRINA	IGNAL	1,02
Coryne CAPM04	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR	0,87
Coryne CAPJ4	CAPRINA	RETROFARINGEO	0,3
Coryne 01MAT	-	MANDIBULAR	0,4
Coryne 02MAT	-	PRÉ-ESCAPULAR	0,4
Coryne 46MAT	-	PAROTIDEO	0,3
Coryne CCAAF	CAPRINA	PAROTIDEO	0,7
Coryne OVI8PV	OVINA	IGNAL	0,25
Coryne OVI9PV	OVINA	PRÉ-ESCAPUALR	0,27
Coryne CAPCCA2	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR	0,14
Coryne OVIGER1	OVINO	PAROTIDEO	0,3
Coryne OVIGER2	OVINO	PRÉ-ESCAPULAR	0,3

Tabela 4. Concentração de proteína após fracionamento (F0/60) de *C. pseudotuberculosis*.

Amostras	Volume (mL)	Proteínas das F 0/60 (mg.mL ⁻¹)
Coryne OVI CCA	3,5	0,16
Coryne OVIOS01	3,5	0,20
Coryne CAPM01	3,5	0,10

Após a saturação e a diálise as frações F0/60 passaram pela cromatografia de troca iônica, no intuito de verificar em quais dos dois picos obtidos na cromatografia estariam as prováveis proteínas SOD, sendo possível distinguir se as mesmas possuíam carga positiva ou negativa. Contudo, observamos nas figuras 1, 2 e 3 que os picos obtidos nas cromatografias apresentam carga positiva, pois a concentração maior de proteína estaria no PI. Já em relação ao PII, foi observado um pico menor de proteínas, conseqüentemente menor concentração de proteínas. A eletroforese nativa corada com NBT após a cromatografia foi visualizado bandas apenas no PI, sendo que essa banda apresenta na altura do controle positivo CuZnSOD (Figura 8).

Na figura 1 da F0/60 da cepa Coryne ovi CCA as alíquotas coletadas no PI foram da 11 até 36, sendo que as alíquotas de maior absorvância foram a 15 e 16 com 2,754 D.O. Em relação ao PII a maior absorvância foi à alíquota 110 com 0,199 D.O.

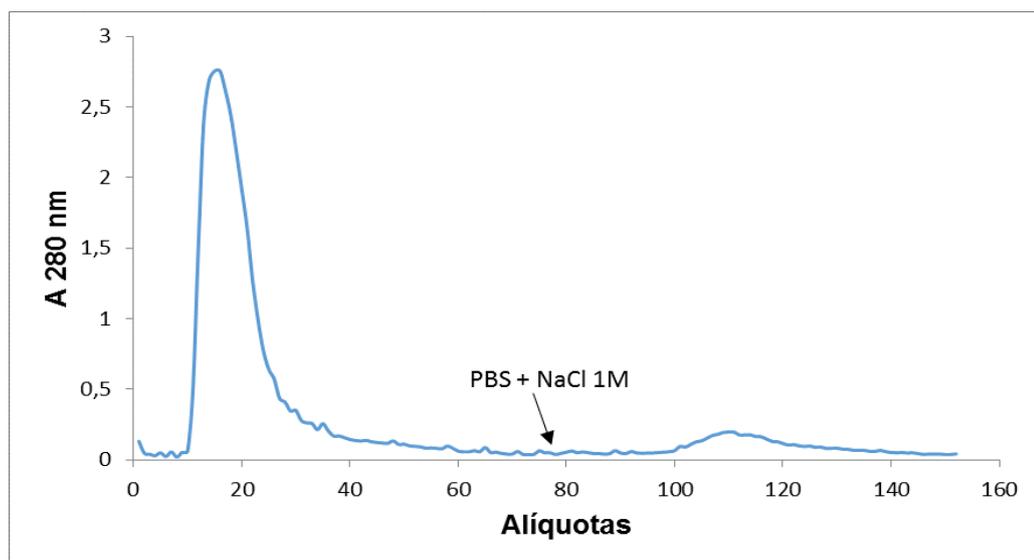


Figura 1: Cromatografia em coluna DEAE – Sephadex A-50 da F0-60 de proteína da amostra Coryne ovi CCA de *C. pseudotuberculosis*.

Na figura 2 da F0/60 da cepa Coryne OVIOS01 as alíquotas obtidas no PI foram da 12 até 57, sendo que a alíquota de maior absorvância foi a 17 com 2,826 D.O. Em relação ao PII a maior absorvância foi à alíquota 104 com 0,134 D.O.

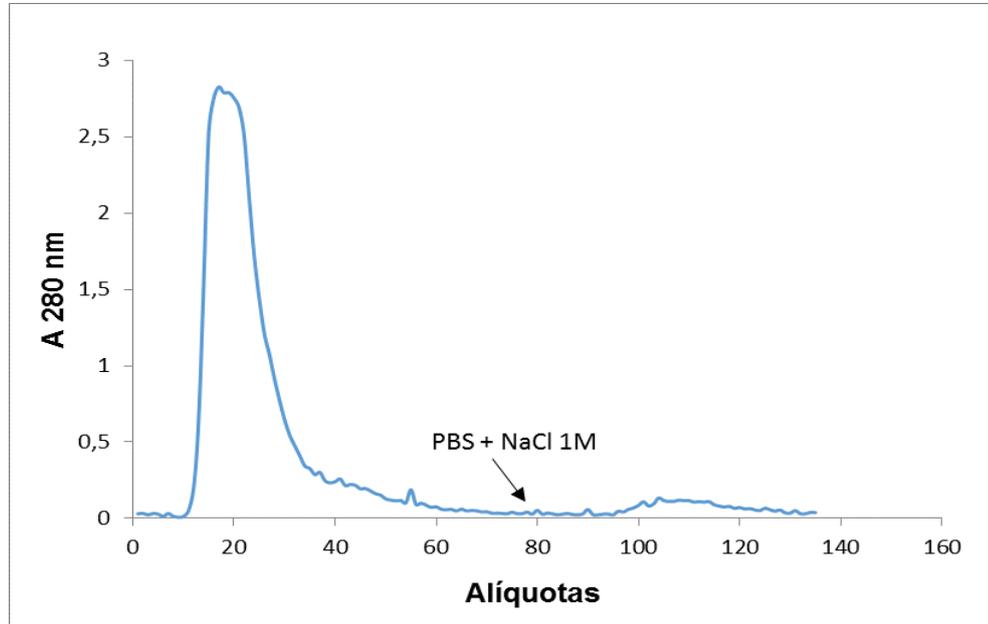


Figura 2: Cromatografia em coluna DEAE – Sephadex A-50 da F0-60 de proteína da amostra Coryne OVIOS01 de *C. pseudotuberculosis*.

Na figura 3 da F0/60 da cepa Coryne CAPM01 as alíquotas obtidas no PI foram de 15 até 36, sendo que a alíquota de maior absorvância foi a 20 com 1,486 D.O. Em relação ao PII a maior absorvância foi à alíquota 128 com 0,104 D.O.

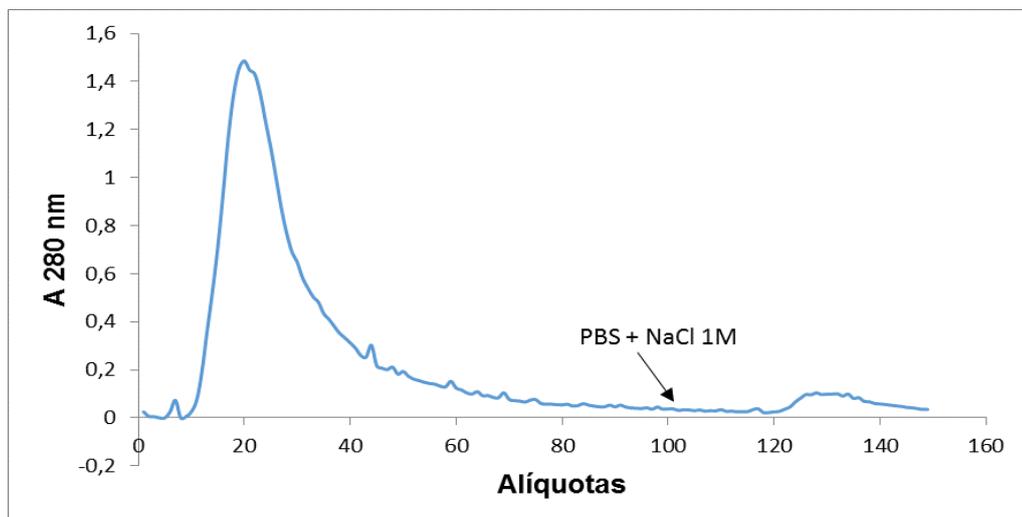


Figura 3: Cromatografia em coluna DEAE – Sephadex A-50 da F0-60 de proteína da amostra Coryne CAPM01 de *C. pseudotuberculosis*.

Para confirmar a presença de proteínas nas cepas bacterianas extraídas, foi realizado a SDS-PAGE do EB e F 0/60. Na figura 4, observamos bandas de proteínas, na qual após o fracionamento essas bandas se repete na mesma altura do EB. Entretanto, percebe-se que a saturação com 60% de sulfato de amônia apresentaram resultados satisfatório nas cepas bacterianas estudadas.

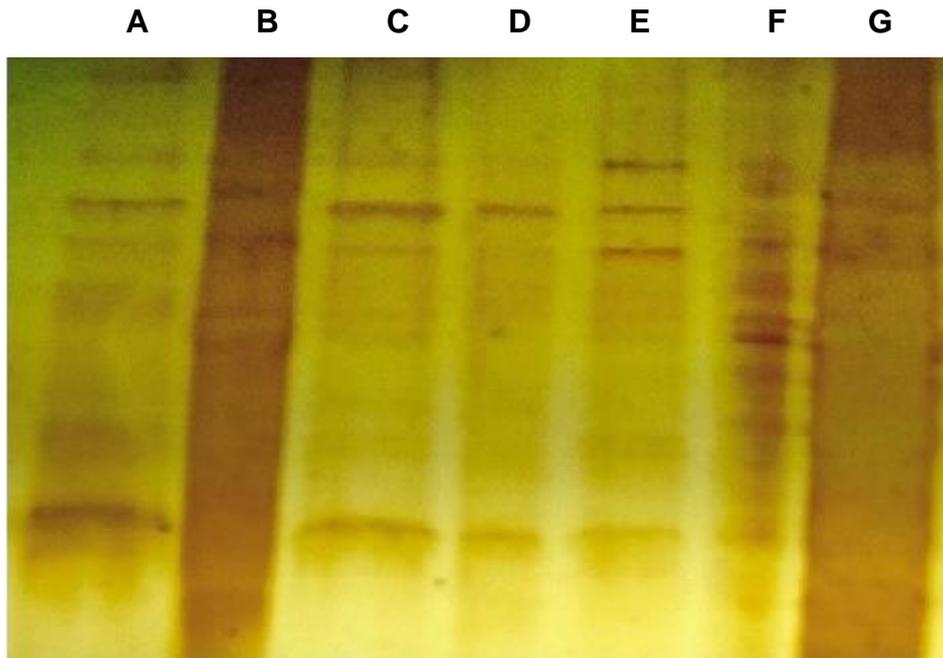


Figura 4. SDS-PAGE de proteína do extrato bruto (EB) e Fração (F0/60) dos isolados de *C. pseudotuberculosis* corado com prata. A: EB do isolado Coryne OVI1FL; B: EB do isolado coryne OVIOS01; C: F0/60 do isolado Coryne OVIOS01; D: F0/60 do isolado Coryne OVI1FL; E: F0/60 do isolado Coryne cap2FL; F: EB do isolado Coryne cap2FL e G: EB do isolado Coryne OVICCA.

Para analisar a presença da superóxido dismutase foi realizado a eletroforese nativa com NBT e riboflavina. Das 30 amostras estudadas, 17 foram negativas, pois as mesmas não apresentaram bandas no gel. No entanto, 9/30 apresentaram apenas uma banda visível no gel, e 4/30 amostras apresentaram mais de uma banda.

Na figura 5 e 6, podemos visualizar as bandas presente no gel que foram coradas com o NBT, pois visualizamos bandas acromáticas em um fundo roxo em diferentes alturas, pois algumas amostras percebem-se uma corrida lenta, e outras rápidas, isso devido ao tipo de SOD que as mesmas apresentaram. Para confirmar fenotipicamente a presença da CuZnSOD nas amostras estudadas, foi utilizado um controle positivo de CuZnSOD (Sigma), sendo que dos 9 isolados 4 apresentaram

bandas na altura do controle positivo, classificando como CuZnSOD (Figura 8). Os outros cinco isolados através dos inibidores foi possível classificar como MnSOD (Figura 9). Os quatro isolados que apresentaram mais de um banda foi possível classificar como CuZnSOD e MnSOD (Figura 10).

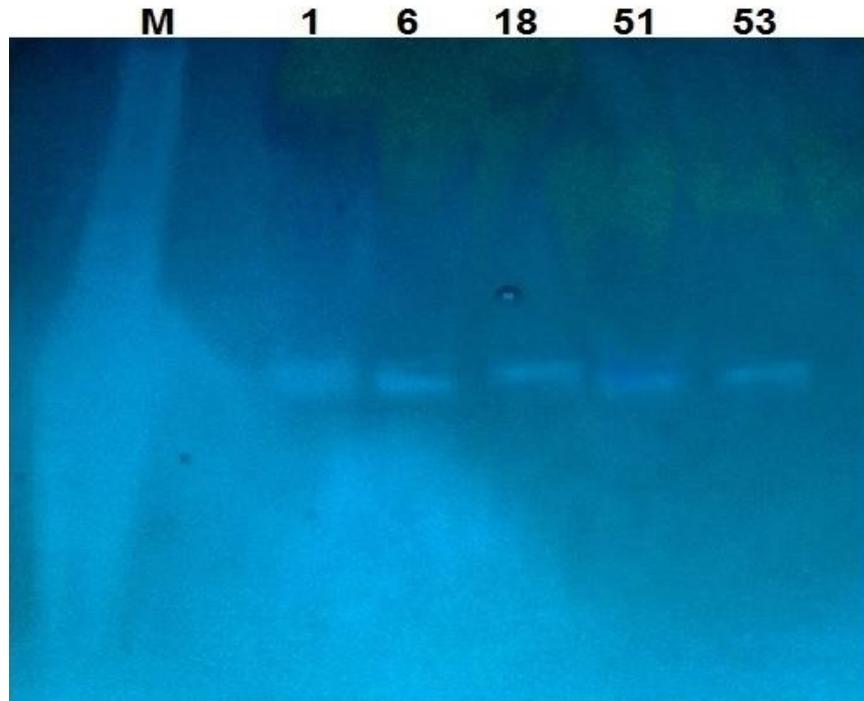


Figura 5: Análise eletroforético da atividade de SOD em gel nativo corado com NBT. Gel com bandas únicas em amostras representativas de isolados de *C. pseudotuberculosis*. M: marcador CuZnSOD (Sigma); 1: Coryne OVICCA; 6: Coryne OVI1FL; 18 Coryne cap1C; 51: Coryne OVID04 e 53: Coryne OVIZ02.

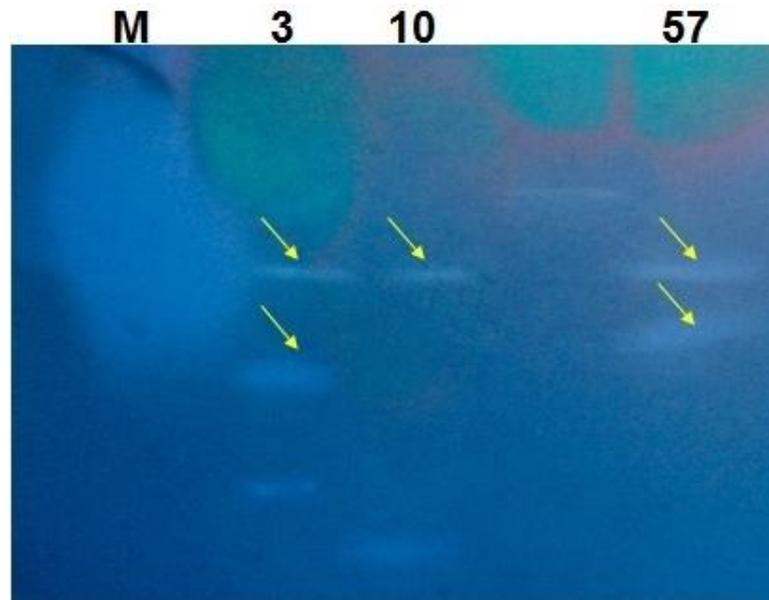


Figura 6: Análise eletroforético da atividade de SOD em gel nativo corado com NBT. Gel com várias bandas em altura diferente em amostras representativas de isolados de *C. pseudotuberculosis*. M: marcador CuZnSOD (Sigma); 3: Coryne OVI79PV; 10 Coryne cap

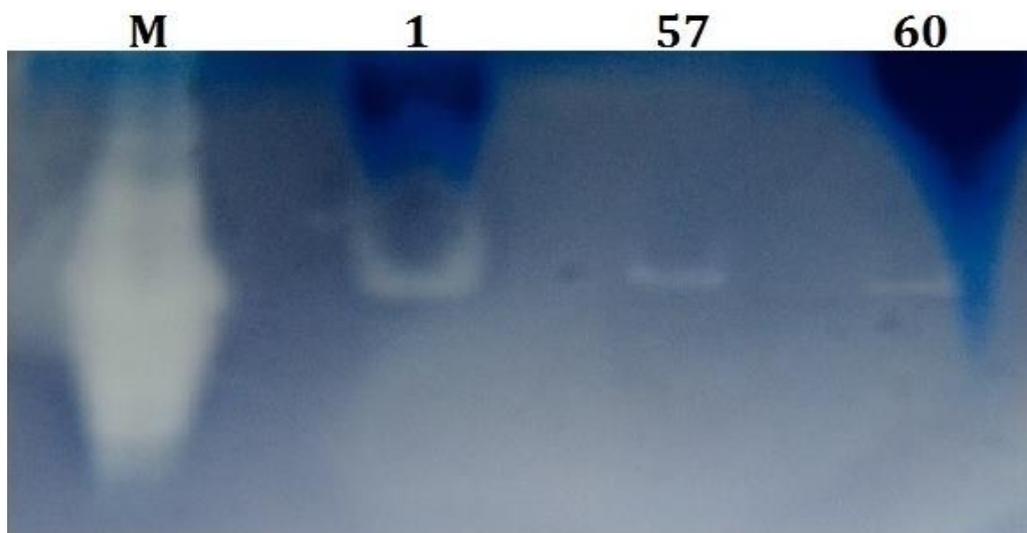


Figura 7. Gel corado com NBT mostrando bandas do PI das amostras 1: Coryne OVI CCA; 2:Coryne OVIOS01 ; 3: Coryne CAPM01 e M: marcador CuZnSOD (Sigma) das amostras após a cromatografia de troca iônica.



Figura 8: Análise eletroforética da atividade de SOD, corado com NBT. M: controle positivo CuZnSOD (Sigma); EB: extrato bruto de proteína *C. pseudotuberculosis* (Coryne CAPGE03).



Figura 9: Análise eletroforético da atividade de SOD. Gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidor; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H₂O₂, inibido com 10 mM de H₂O₂, em extrato bruto de proteína de *C. pseudotuberculosis* (Coryne ovi1FL).

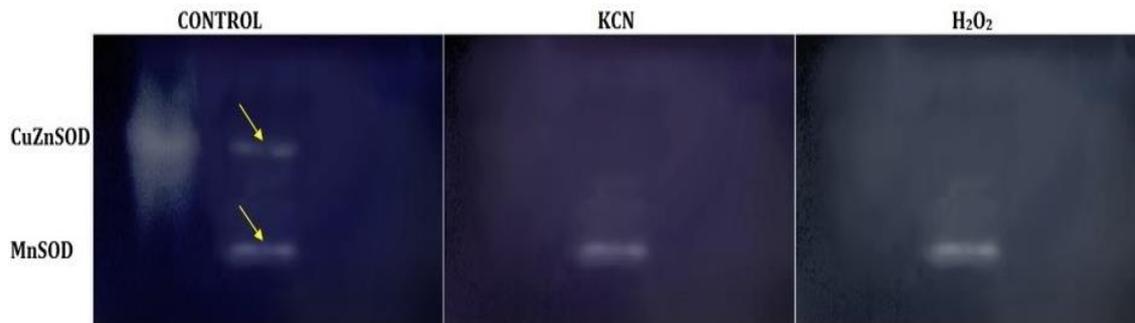


Figura 10: Análise eletroforético da atividade de SOD em gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidores; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H₂O₂, inibido com 10 mM de H₂O₂, em extrato bruto de proteína *C. pseudotuberculosis* (Coryne ovi79PV).

4.1 Caracterização molecular do gene *sodC* e *sodA*

A especificidade das amostras utilizadas foi comprovada pela aplicação do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, permitindo a observação de banda específica na altura de 313 pb. As amostras de *C.pseudotuberculosis* analisadas para presença do gene *sodC* amplificaram bandas de tamanho esperado. Desta forma, todos os isolados estudados foram positivos para presença desse gene, como podemos visualizar na figura 11.

Em relação ao gene *sodA* a amplificação das amostras em gel de agarose permitiu visualizar bandas na altura de 411 pb, confirmando que todos os isolados de *C.pseudotuberculosis* apresentavam esse gene (Figura 12).

Os produtos da PCR específica de acordo com o desenho dos primers obtiveram sequências com alta qualidade, sendo o PHRED acima de 20, com isso, pelo o sequenciamento foi possível confirmar a identidade dos genes *sodA* e *sodC* nos isolados de *C.pseudotuberculosis*.



Figura 11. Produto da PCR do gene *sodC* em *C. pseudotuberculosis*, sendo que M: marcador molecular e 1 a 15 amostras representativas de DNA de *C. pseudotuberculosis*.

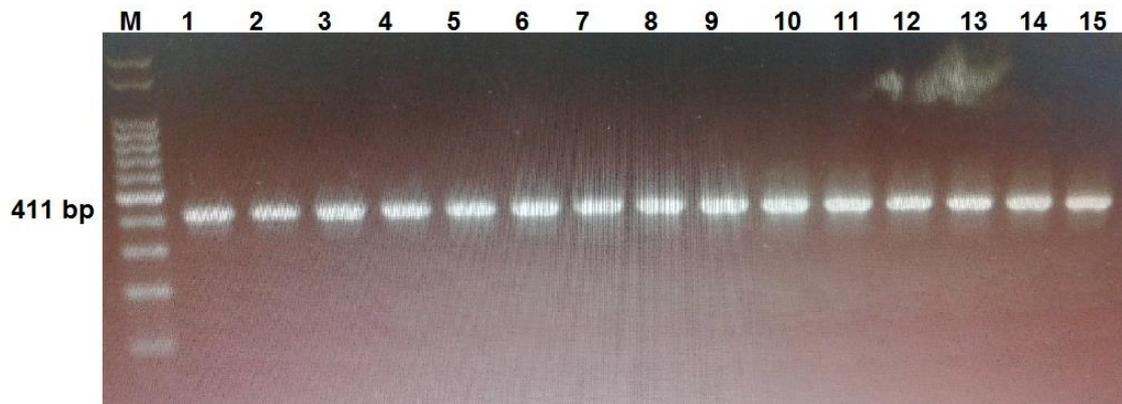


Figura 12. Produto da PCR do gene *sodA* em *C. pseudotuberculosis*, sendo que M: marcador molecular e 1 a 15 amostras representativas de DNA de *C. pseudotuberculosis*.

5. DISCUSSÃO

Os valores obtidos de proteína total nos isolados bacteriana de *C. pseudotuberculosis* estudadas, não apresentaram resultados satisfatórios para todos os isolados. O método de extração utilizado para alguns isolados obteve baixo índice de proteína total, isso pode ter ocorrido pela dificuldade que a bactéria apresenta em romper a parede celular, sendo este um importante mecanismo de defesa de patógenos intracelulares como é o caso do *C. pseudotuberculosis* (DORELLA et al., 2006).

A parede celular da *C. pseudotuberculosis* contém lipídeos, sendo essa característica encontrada em outros gêneros de bactérias como, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium* (BAIRD, 2003). Porém, foi utilizado o detergente Tween-80 com o objetivo de dissolver a camada lipídica desta parede, facilitando o rompimento através do choque térmico no nitrogênio líquido e nas ondas mecânica do sonicador. Estudo realizado por Gumber et al., (2007) com *Mycobacterium paratuberculosis* revelou que a utilização Tween-20 apresentou melhor resultados na lise bacteriana em relação a outros métodos estudados, sendo a máxima concentração obtida para as proteínas de 0,62-0,67 mg/mL⁻¹. No presente estudo podemos visualizar que para alguns isolados, os resultados melhores foi de 3,4 mg/mL⁻¹.

A saturação com sulfato de amônia precipita a proteína (GREEN e HUGHES, 1995), nesse estudo foi realizada a saturação com 60% (F0/60) de sulfato de amônia, na qual não obtive resultados satisfatórios, pois a concentração de proteínas diminuiu após a saturação e diálise. Estudo realizado por Paule et al., (2004) comparou três tipos diferentes de fracionamento com sulfato de amônia (15%, 30% e 60%) em *C. pseudotuberculosis*, sendo que o melhor fracionamento foi obtido na concentração de 30%. Desta forma, podemos indicar que um dos motivos para a menor precipitação com o sulfato de amônia realizado no presente estudo pode estar associado à concentração utilizada no fracionamento que foi de 60%.

A confirmação da concentração de proteína foi realizada por análise quantitativa através da metodologia de Bradford (1971), para se obter uma caracterização mais detalhada realizou-se a técnica de SDS-PAGE, na qual se visualizaram diversas bandas no gel. Assim também, Gumber et al., (2007) realiza essa técnica com o mesmo intuito de confirmar a extração em *Mycobacterium*

paratuberculosis visualizando diversas bandas de massa molecular aparente no gel confirmando a eficácia da extração. Estudo realizado em *Lactococcus lactis* encontrou massa molecular de 27 KDa para MnSOD em SDS-PAGE (Tan et al., 2014).

Em isolados de *C. pseudotuberculosis*, Paule et al., (2004) identifica através da técnica de SDS-PAGE bandas isoladas com o massa molecular 20,1 kDa utilizando uma precipitação de sulfato de amônia com 30% em pH 4,0. Essa massa molecular aproxima-se da encontrada em *Lactococcus lactis*, que foi isolado a enzima MnSOD, apresentando massa molecular próximo 27 KDa, essa enzima também foi purificada pelo método de cromatografia de troca iônica, após foi realizada eletroforese corada com NBT e visualizada bandas que foi tratada com inibidores, cianeto de potássio e H_2O_2 . A enzima MnSOD não inibe banda na presença desses dois inibidores (TAN et al., 2014).

A cromatografia de troca iônica utilizando DEAE-Sephadex A-50 teve o objetivo de purificar e localizar a enzima SOD nas amostras estudadas, na qual percebemos a presença de bandas no gel corado com NBT apenas no PI. Do mesmo modo, estudo realizado com o fungo *Metarhizium anisopliae* utilizou a mesma coluna de cromatografia, mas apresentou vários picos de proteínas, tanto no PI como no PII, sendo encontrada a CuZnSOD no PII (BITTENCOURT et al., 2004). Em *E.coli* foi utilizada a mesma metodologia em estudo de Petkar et al., (2013). Este estudo tinha como objetivo encontrar e purificar a CuZnSOD, sendo utilizada a coluna de cromatografia DEAE-Sephadex, que demonstrou a presença da CuZnSOD no PI, e na SDS-PAGE a enzima apresentou massa molecular de 35,71 KDa.

Em relação a esse estudo, podemos perceber que a metodologia utilizada para detectar e classificar a enzima SOD, no que se referem à caracterização fenotípica, os resultados obtidos não foi satisfatório. Pois, a quantidade total de proteína extraída pode ter sido um fator limitante para obtenção dos resultados de caracterização da SOD. A classificação no tipo SOD foi realizado nesse trabalho, utilizado inibidores específicos, como também controle positivo CuZnSOD para verificar o tipo SOD.

Estudo realizado Bittencourt et al., (2004) utilizou cianeto de potássio e peróxido de hidrogênio como inibidores em gel corado com NBT para classificar o tipo SOD em fungo *Metarhizium anisopliae*. No presente estudo foi realizado

também o mesmo protocolo para detectar a presença das SODs. A presença de H_2O_2 inibi a formação de bandas para CuZnSOD em gel corado com NBT em isolados de *Coxiella burnetii* (BRENNAM et al., 2015), como também em *E.coli* (PETKAR et al., 2013).

A superóxido-dismutase (SOD) de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 foi purificada e caracterizada com o intuito de identificar o cofator metálico presente na SOD, sendo que a enzima estudada apresenta massa molecular nativo de 80 kDa, enquanto a massa molecular de 24 kDa foi encontrada em SDS-PAGE. O gel nativo para SOD revelou uma única banda referente a enzima, sendo a mesma classificada como MnSOD (LIAO et al., 2013). Estes resultados diferem dos descritos na presente pesquisa, uma vez que em *C. pseudotuberculosis* foram encontradas CuZnSOD e MnSOD.

Estes achados são reforçados pela detecção por PCR em todos os isolados de *C. pseudotuberculosis* testados dos genes *sodA* e *sodC*, resultado a qual confirmamos a presença de MnSOD no gene *sodA* e CuZnSOD no gene *sodC*. A caracterização molecular nesse trabalho mostrou diferença em relação à fenotípica. Esta diferença pode ser explicada pela maior precisão, eficiência e sensibilidade da técnica de PCR (PACHECO et al., 2007). Dificuldades na extração de proteína foi o fator que desfavoreceu os resultados fenotipicamente.

Estudo realizado por MERKAMM e GUYONVARCH (2001) caracteriza a presença do gene *sodA* em *Corynebacterium melassecola*, metodologia obtida através de clonagem realizada com a bactéria. PIDDINGTON et al., (2001) em seu estudo estabelece que o *M.tuberculosis* apresenta a enzima CuZnSOD, na qual foi detectado o gene *sodC*, sendo esse gene responsável em desenvolver fator de resistência para essa bactéria dentro dos macrófagos. Do mesmo modo, o *Streptococcus thermophilus* para poder crescer em meio aeróbico necessita do gene *sodA*, pois na ausência do MnSOD pode oferecer proteção parcial para a bactéria (ANDRUS et al., 2003). Em *Pasteurella multocida*, foi observado resultado similar a esse trabalho, pois de 25 isolados estudados todos foram positivo para o gene *sodC* e apenas um isolado foi negativo para o gene *sodA* (Furian et al., 2013).

Análise do genoma de *C. pseudotuberculosis* FRC41 isolado de humano foi codificado dois tipo de superóxido dismutase, os genes *sodA* e *sodC*, na qual contribui com a virulência do patógeno (TROST et al., 2010). No presente estudo foi

possível verificar a presença destes genes em 30 isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes, indicando sua conservação dentro desta bactéria.

Em estudos prévios visando caracterizar o papel do gene *sodC* na virulência de *M. tuberculosis* por análise de microscopia eletrônica foi possível determinar que o produto do gene *sodC* tem a função de aderir à membrana externa bacteriana através de lipoproteína de ligação, formando assim uma membrana protetora para bactéria, permitindo sua resistência ao ion superóxido extracelular (WU et al., 1998; DORAZIO et al., 2001). Da mesma forma, com o objetivo de definir o papel da molécula SOD na resposta imune à infecção por *M. Tuberculosis*, estudo realizado por Liao et al., (2013) sugeriu que a ausência da SOD pode estimular a imunidade inata a destruição o *M. tuberculosis*. Nesse estudo, investigaram que a proteína SOD, que apresenta o gene *sodA* e *sodC* ajuda *M. tuberculosis* sobreviver dentro dos macrófagos. Dada a relação genética e dos mecanismos de patogenicidade entre o *C. pseudotuberculosis* e *M. tuberculosis* (DORELLA et al., 2006) pode se supor a grande importância da presença de SOD nestes micro-organismos.

Estudos futuros devem ser desenvolvidos com o intuito de identificar protocolos eficazes sobre o mecanismo da SOD, podendo contribuir com a terapia clínicas, bem como com a prevenção da linfadenite caseosa (LIAO et al., 2013).

6. CONCLUSÕES

A enzima superóxido dismutase foi identificada em isolados de *C. pseudotuberculosis* obtido de pequeno ruminantes, bem como, a presença dos genes *sodA* e *sodC*, classificando respectivamente a MnSOD e CuZnSOD. Assim, mais estudos são necessários em relação à SOD, a fim de caracterizar seu papel na patogenicidade em *C. pseudotuberculosis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL A, GUPTA S, SHARMA RK. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v.3:28, 2005.
- ALVES, M. L. et al. Linfadenite caseosa: Revisão de literatura. **Revista Científica Elet. de Med. Veterinária**, ano VI, n. 11, 2008.
- ALVES F.S.F., Santiago L.B & Pinheiro R.R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Documentos, Embrapa Caprinos**, Sobral. p. 60, 2007.
- ANDRADE, J.S.L., AZEVEDO., S.S., TELES., L.A.A., et al., Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesq. Vet. Bras.**, Fev. 2012.
- ANDRUS., L.M. et al. Molecular characterization and functional analysis of the manganese-containing superoxide dismutase gene (sodA) from *Streptococcus thermophilus* AO54. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v. 420 p.103–113, 2003.
- BAFANA, A. et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 68 p. 129–138, 2011.
- BAIRD GJ. Current perspectives on caseous lymphadenitis. **J Postgrad Clin Study**. v.25, 62-68, 2003.
- BAIRD, G.J., FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp. Pathol**. v.137, p. 179–210, 2007.
- BAIRD, G.J., FONTAINE, M.C. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**. V.76, p. 42–48, 2008.
- BANDEIRA, D. A. et al. Característica de produção da caprinocultura leiteira na região do Cariri na Paraíba, **Ciência Veterinária Tropical**, v. 10, n. 1, p. 29 – 35, 2007.

BEAUCHAMP, C; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Nalytical biochemistry**. v. 44 p. 276-287,1971.

BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 41-45, 2002.

BITTENCOURT, S.E.T. et al., Purification and ultrastructural localization of a copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. **Research in Microbiology** v. 155 p. 681–687, 2004.

BRENNAM, R.E. et al. Cloning, expression, and characterization of a *Coxiella burnetii* Cu/Zn Superoxide dismutase. **BMC Microbiology**, 2015.

CAMARGO. E.V. et al. Isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um carneiro na região central do Rio grande do sul . **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.139-142, jan./mar., 2010.

CAMPOS, A.C.N. Do campus para o campo: Tecnologias para produção de ovinos e caprinos. **Gráfica nacional**. P. 118-121, 2005.

COELHO. M.C.S.C. et al. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos criados em assentamentos no município de Petrolina-PE. **Revista Semiárido De Visu**, v.1, n.1, p. 32-40, 2011.

COSTA, L.F.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the ethiological agent of the caseous lymphadenitis in goats. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 1, p. 105-115, nov. 2002.

CHENG, S. et al. The iron-cofactored superoxide dismutase of *Edwardsiella tarda* inhibits macrophage-mediated innate immune response. **Fish & Shellfish Immunology** v. 29, p. 972-978, 2010.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Rec**, v. 37, p. 201-218, 2006.

D'ORAZIO, M., FOLCARELLI, S., MARIANI, F. et al. Lipid modification of the Cu,Zn superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochem. J.** v. 359, 17–22, 2001.

FANG, F.C. et al., Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. **Proc Natl Acad Sci.** v. 96, p.7502-7512, 1999.

FONTAINE M.C. & BAIRD G.J. Caseous lymphadenitis. **Small Rum. Res.** 76:p. 42-48, 2008

FURIAN, T.Q. et al. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR, **Pesq. Vet. Bras.** v. 33, p.177-182, 2013.

FRÉALLE, E. Manganese superoxide dismutase based phylogeny of pathogenic fungi. **Elsevier.** v. 41, p. 28-39, 2006.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Rev. Biochem.** V. 44, p. 147-159, 1975.

FRIDOVICH, Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** v. 64 p.97-112, 1995.

GAUTIER, A.L. et al. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *soda* gene. **Journal of clinical microbiology.** v. 43, p. 2307-2314, 2005.

GUMBER, S. et al. Protein extraction from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: Comparison of methods for analysis by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, native PAGE and surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods.** v. 68, p.115–127, 2007.

GUIMARÃES, A.S. et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research,** v.87, p.86-91, 2009.

HOLMBLAD, T., SODERHALL, K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture** v. 172, p. 111–123, 1999.

IBGE, **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro .v.39, pag. 1-63. 2011

JUNIOR, P;J.W. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* experimental infection of goats mamary gland. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, p.395-400, out./dez., 2006.

KROLL, J.S. et al. Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all!. **Microbiology**. v 141, p. 2271-2279, 1995.

KOHEN R., NYSKA A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v.30, p. 620-650 2002

KUMARESAN, V. et al. Comparative analysis of CsCu/ZnSOD defense role by molecular characterization: Gene expression-enzyme activity-protein level. **Gene**, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227 p. 680-685, 1970.

LIAO D. et al. The Role of Superoxide Dismutase in the Survival of Mycobacterium tuberculosis in Macrophages. **Jpn. J. Infect. Dis.**,v. 66, 480-488, 2013

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

MERKAMM M, GUYONVARCH A: Cloning of the sodA gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability. **J Bacteriol**. v. 183 p.1284-1295, 2001.

McCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of Medicine.** p. 652-659. 2000.

NATHAN, C; SHILOH, M. S. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Pnas.** v. 97 p. 8841–8848, 2000.

NORDBERG J.; ÁRNER E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.

NOZAKI, C.N., FARIA, M.A.R., MACHADO, T.M.M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arq. Inst. Biol**, v.67, n.2, p.187-189, jul./dez., 2000.

PACHECO L.G.C., et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med. Microbiol.** v.56, p. 480-486, 2007.

PACHECO, L.G.C. et al. A role for sigma factor σ^E in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxide stress. **Frontiers in microbiology.** v. 3, 2012.

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

PAULE, B.J.A. et al. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Protein Expr. Purif.** v.34, p. 311-166, 2004.

PETKAR, M.B. et al. Purification and Characterization of Superoxide Dismutase Isolated From Sewage Isolated E. coli. **J Microb Biochem Technol.** v.5, p. 102-106, 2013.

PEDROSA, K. Y. F et al. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. **Caatinga**, v. 16, n. ½, p. 17-21, 2003.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.52, n.5, p.534-543, 2000.

PIDDINGTON, L.D. et al., Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst. **Infection and immunity**. p.4980-4987, 2001.

QUINN, P.J. et al. Clinical Veterinary Microbiology. **WOLFE**, p. 648, 1994.

QUINN P.J., MARKEY B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. **Artmed**, p. 67-70 Porto Alegre. 2005.

RADOSTITS, O.M. et al. Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos. **Guanabara Koogan**, ed. 9, Rio de Janeiro, 2002.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J.A.H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.10, n.2, p.23-24, 1988.

RIBEIRO, M.G. et al. Citologia aspirativa no diagnóstico da linfadenite em ovinos, **Pesq. Vet. Bras.** V. 10, p. 839-843, outubro 2011

RIVERS, R. et al. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. **Arch. Med.** v. 38, 2006.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains, **PLoS ONE** , v. 6, p. 1-16, 2011.

SAMPAIO, B. et al. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas, **Revista de Economia**, v. 35, n. 2, p. 137-159, Editora UFPR, 2009.

SÁ., M.C.A. et al. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesq. Vet. Bras.** v. 33 p.1319-1324, 2013.

SEYLER, R.W et al. Superoxide Dismutase-Deficient Mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to Oxidative Stress and Defective in host colonization. **infection and immunity**. v. 69 p. 4034-4040, 2001.

SOUZA, F.M. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.** v.31: p. 224-230, março 2011.

TAN, B.H. et al. Molecular Characterization of a Recombinant Manganese Superoxide Dismutase from *Lactococcus lactis* M4. **BioMed Research International.** 2004.

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

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VERMA, S. et al. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. **Vet Res Commun.** v. 37, p.83–89, 2013.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidadellhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, p. 406-414, São Paulo: 2009.

WU, C.H.H. et al. Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS Letters.** v. 439, p. 192-196, 1998.

WUERGES, J. et al. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **PNAS.** v 101, p. 8569–8574, 2004.

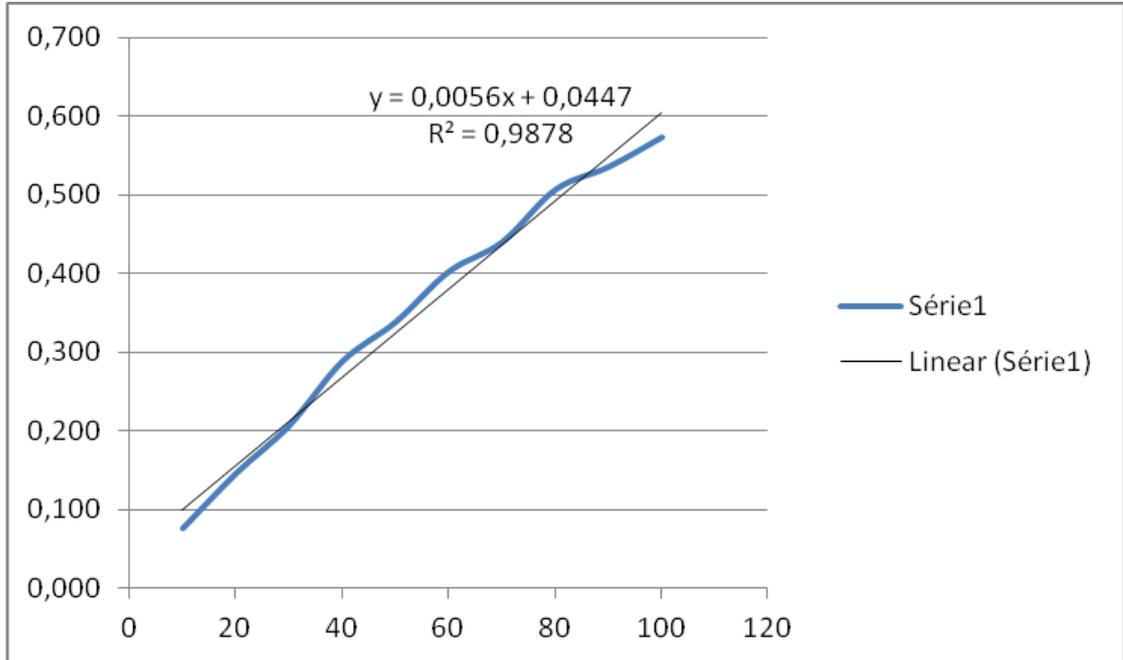
ZAHRT, T.C, DERETIC V: Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antioxid Redox Signal.** v.4 p.141-159, 2002.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A – Lista dos isolados de *C. pseudotuberculosis*

Nº	Amostras	Espécie	Linfonodo
1	Coryne ovi CCA	OVINA	MANDIBULAR
3	Coryne ovi79PV	OVINA	G.MAMÁRIA
6	Coryne ovi1FL	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR
10	Coryne cap2FL	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR
15	Coryne Ovi1C	OVINA	MANDIBULAR
16	Coryne Ovi2C	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR
18	Coryne Cap1C	CAPRINA	PAROTÍDEO
21	Coryne Cap3W	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR
26	Coryne Ovi1W	OVINA	G.MAMÁRIA
48	Coryne CR01	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR
49	Coryne CR07	CAPRINA	INGUINAL
50	Coryne OVID02	OVINA	PAROTÍDEO
51	Coryne OVID04	OVINA	RETROFARINGEO
53	Coryne OVIZ02	OVINA	PAROTÍDEO
55	Coryne CAPGE03	CAPRINA	G.MAMÁRIA
57	Coryne OVIOS01	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR
58	Coryne OVIOS03	OVINA	PAROTÍDEO
60	Coryne CAPM01	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR
61	Coryne CAPM02	CAPRINA	INGUINAL
62	Coryne CAPM04	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR
76	Coryne CAPJ4	CAPRINA	RETROFARINGEO
93	Coryne 01MAT	-	MANDIBULAR
94	Coryne 02MAT	-	PRÉ-ESCAPULAR
125	Coryne 46MAT	-	PAROTÍDEO
413	Coryne CCAAF	CAPRINA	PAROTÍDEO
416	Coryne OVI8PV	OVINA	INGUINAL
417	Coryne OVI9PV	OVINA	PRÉ-ESCAPULAR
422	Coryne CAPCCA2	CAPRINA	PRÉ-ESCAPULAR
429	Coryne OVIGER1	OVINO	PAROTÍDEO
430	Coryne OVIGER2	OVINO	PRÉ-ESCAPULAR

8.2 ANEXO B – Curva da Albumina sérica bovina – Técnica de Bradfor



8.3 ANEXO C – Confirmação do gene *sodA* no BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain VD57, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP009927.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain F1_2193/67, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP008924.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain CS_10, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP008923.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain 48252, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP008922.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis Cp162, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003652.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 258, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003540.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 31, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003421.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 267, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003407.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis P54896, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003385.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 316, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003077.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 3/99-5, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003152.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 1/06-A, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003082.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis CIP_52_97, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003061.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 42/02-A, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP003052.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis PAT10, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP002924.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP001809.2
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 119, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP002251.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis C231, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP001829.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41, complete genome	320	320	100%	4e-84	100%	CP002097.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium ulcerans strain 05146, complete genome	209	209	100%	9e-51	88%	CP009716.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium ulcerans FRC11, complete genome	209	209	100%	9e-51	88%	CP009622.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium ulcerans strain 210931, complete genome	209	209	100%	9e-51	88%	CP009583.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium ulcerans 0103 DNA, complete genome	209	209	100%	9e-51	88%	AP012284.1

8.4 ANEXO C – Confirmação do gene *sodC* no BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain VD57, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP009927.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain Ft. 2193/67, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP008924.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain CS_10, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP008923.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain 48252, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP008922.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 267, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP003407.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis P54896, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP003385.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 3/99-5, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP003152.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP001809.2
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 119, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP002251.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41, complete genome	366	366	100%	6e-98	100%	CP002097.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis Cp16Z, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003652.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 258, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003540.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 31, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003421.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 316, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003077.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 1/06-A, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003082.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis CIP 52.97, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003061.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 42/02-A, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP003062.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis PAT10, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP002924.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis C231, complete genome	361	361	100%	3e-96	99%	CP001829.1