



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com  
potenciais antigênicos**

**JOSÉ TADEU RAYNAL ROCHA FILHO**

**SALVADOR – BAHIA**

**DEZEMBRO/2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*  
com potenciais antigênicos**

**JOSÉ TADEU RAYNAL ROCHA FILHO**

**SALVADOR - BAHIA**  
**DEZEMBRO/2016**

RAYNAL ROCHA FILHO, JOSÉ TADEU  
Moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com  
potenciais antigênicos / JOSÉ TADEU RAYNAL ROCHA FILHO. -  
- SALVADOR, 2016.  
93 f. : il

Orientador: José Meyer Nascimento.  
Coorientador: Bruno Lopes Bastos.  
Tese (Doutorado - Biotecnologia) -- Universidade  
Federal da Bahia, INSTITUTO DE CIÊNCIA DA SAÚDE, 2016.

1. *C. pseudotuberculosis*. 2. meios de cultura. 3.  
quelantes de ferro . 4. proteínas de membrana  
bacteriana. I. Meyer Nascimento, José. II. Lopes  
Bastos, Bruno. III. Título.

**JOSÉ TADEU RAYNAL ROCHA FILHO**

**Moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*  
com potenciais antigênicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

Co-orientador: Prof Dr. Bruno Lopes Bastos.

**SALVADOR - BAHIA  
DEZEMBRO/2016**



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

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



Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: [renorbio@ufba.br](mailto:renorbio@ufba.br)

### TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“Moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com potenciais antigênicos”

Elaborada por:

JOSÉ TADEU RAYNAL ROCHA FILHO.

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

Salvador, Bahia, 15 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

**Dr. Roberto José Meyer Nascimento** (Orientador)  
 Universidade Federal da Bahia

**Dr. Lília Ferreira Moura Costa**  
 Universidade Federal da Bahia

**Dr. Ricardo Wagner Dias Portela**  
 Universidade Federal da Bahia

**Dr. Soraya Castro Trindade**  
 Universidade Estadual de Feira de Santana

**Dr. Bruno Lopes Bastos**  
 Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

À Deus,  
À minha família,  
Aos Drs. Roberto Meyer, Ricardo Portela e Bruno Bastos,  
Às Dras. Lilia Ferreira de Moura-Costa e Soraya Trindade  
À Dra. Fátima Costa Silva,  
A doutoranda Maria Conceição Aquino,  
Aos colegas Marcos Costa, Mariana Assis, Iona Brito, Fúlvia Soares, Aretha Alves,  
Geraldo Pedral,  
SR. Edimario, D. Chica (Francisca Soares), Zilda, Jussi,  
Aos estagiários Amália, Maria Emília, Gilvan, Isabela, Natália, Kauã e Helenita,  
Ao grupo Labimuno que certamente esqueci de mencionar todos que convivi ao longo  
destes anos,  
À FAPEX,  
A todos que ajudaram e atrapalharam, pois me fizeram seguir em frente e crescer,  
A todas as pessoas que participaram da execução deste trabalho.

## LISTAS DE FIGURAS

<b>3. METODOLOGIA</b> .....	20
<b>FIGURA 1.</b> FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA O FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES ESTRUTURAIS DO <i>C. PSEUDOTUBERCULOSIS</i> COM BASE EM SUAS CARACTERÍSTICAS DE HIDROFOBICIDADE. ....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>FIGURA 1.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO QUELANTE MESILATO DE DEFERROXAMINA (DFX), EM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO (MQD), FRENTE AS DUAS CEPAS DE CP TESTADAS. ....	32
<b>FIGURA 2.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO QUELANTE MESILATO DE DEFERROXAMINA (DFX), EM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO (MQD) SUPLEMENTADO COM CLORETO DE FERRO HEXAHIDRATADO, FRENTE AS DUAS CEPAS DE CP TESTADAS. ....	33
<b>FIGURA 3.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO RPMI SUPLEMENTADO COM SORO OVINO ASSOCIADO AO QUELANTE, FRENTE AS DUAS CEPAS DE CP TESTADAS. ....	34
<b>FIGURA 4.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO RPMI ASSOCIADO AO QUELANTE, FRENTE AS DUAS CEPAS DE CP TESTADAS. ....	34
<b>FIGURA 5.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO BHI ASSOCIADO AO QUELANTE, FRENTE AS DUAS CEPAS DE CP TESTADAS. ....	35
<b>FIGURA 6.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO SFB ASSOCIADO AO QUELANTE, FRENTE AS DUAS CEPAS DE CP TESTADAS. ....	35
<b>FIGURA 7.</b> CURVA DE CRESCIMENTO TESTANDO MEIO DE CULTURA ADULTAL, E O MQD COMO MODELO COMPARATIVO FRENTE A CEPA VD57 DE CP. ....	36
<b>5. PATENTE</b> .....	37
<b>FIGURA 1.</b> FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA O FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES ESTRUTURAIS DE <i>C. PSEUDOTUBERCULOSIS</i> COM BASE EM SUAS CARACTERÍSTICAS DE HIDROFOBICIDADE.....	43
<b>FIGURA 2.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE 15% DA FRAÇÃO F3 DE MOLÉCULAS ESTRUTURAIS HIDROFÓBICAS DE <i>C.</i>	

PSEUDOTUBERCULOSIS DA CEPA VD57 CORADO PELO NITRATO DE PRATA .....44

**FIGURA 3.** PERFIL DE RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO POR IGG DE ANTÍGENOS ESTRUTURAIS DA FRAÇÃO F3 EXTRAÍDOS DE C. PSEUDOTUBERCULOSIS DA CEPA VD57. AS MEMBRANAS FORAM INCUBADAS COM POOLS DE SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LINFADENITECASEOSA; AS AMOSTRAS INCUBADAS COM O POOL NEGATIVO NÃO FORAM INCLUÍDAS NA FIGURA POR NÃO APRESENTAREM RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO ALGUM.....45

**FIGURA 4.** CURVA ROC COM OS RESULTADOS DOS DOIS TESTES ELISA.....46

**FIGURA 5.** Esquema de padronização do ELISA indireto dos antígenos Sec\_VD57 e Memb\_VD57. B – branco, CN – controle negativo e CP – controle positivo.....47

**4. ARTIGO CIENTÍFICO 1..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

**FIGURE 1.** PROTEIN-PROTEIN INTERACTION NETWORK CONSTRUCTED WITH PATHOGENIC MEMBRANE PROTEINS EXPRESSED BY C. PSEUDOTUBERCULOSIS GROWN IN ANIMAL SERUM. THE NETWORK WAS RE-CENTERED ON THE OPPCD AND CIUA PROTEIN NODES. PROTEIN NODES IN GREY COLOR REPRESENT PROTEIN INTERACTORS THAT WERE AUTOMATED INCLUDED BY STRING TO CONTRUCT A COMPLETE NETWORK. .... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

**ADDITIONAL FILE 2.** LIST OF IDENTIFIED PROTEINS IN LC-MS/MS ANALYSIS AND RESPECTIVE BIOINFORMATICS ANALYSIS. .... 68



**LISTAS DE TABELAS**

<b>5. PATENTE .....</b>	<b>37</b>
-------------------------	-----------

<b>TABELA 1 – GENES DE <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> DEPOSITADOS NO GENPEPT, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) (D’AFONSECA ET AL., 2008). .....</b>	<b>39</b>
--	-----------

<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO 1.....</b>	<b>50</b>
------------------------------------	-----------

<b>TABLE 1. LIST OF MEMBRANE ASSOCIATED PROTEINS EXPRESSED BY <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> GROWN DIRECTLY IN BOVINE FETAL SERUM WITH THEIR RESPECTIVE PATHOGENESIS POTENTIAL. ....</b>	<b>66</b>
---	-----------

**LISTAS DE QUADROS**

<b>3. METODOLOGIA</b> .....	20
<b>QUADRO 1. COMPOSIÇÃO MQD EM G/L.</b> .....	22
<b>QUADRO 2. COMPOSIÇÃO DO RPMI</b> .....	22
<b>QUADRO 3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.</b> .....	23

## RESUMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente causador da linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos, enfermidade associada a perdas econômicas diretas no setor pecuário. Além de ter um curso crônico, o seu tratamento com antibióticos é inviável e não existem vacinas eficazes disponíveis no mercado. Neste experimento, foram utilizadas condições de cultivo *in vitro* que se aproximassem do ambiente das condições *in vivo* encontradas pela bactéria durante a infecção do hospedeiro; isto incluiu a utilização de material biológico animal como meio de cultura e a restrição do ferro livre no meio. Nessas condições, era esperado que o *C. pseudotuberculosis* expressasse perfis proteicos de membrana ainda desconhecidos. Por isso foram utilizadas linhagens bacterianas de baixa (T1) e alta (VD57) virulência, cultivadas em caldo BHI, MQD, MQD suplementado com ferro, RPMI, RPMI suplementado com soro ovino e um meio produzido com material biológico ovino, todos estes com e sem suplementação de agentes quelantes de ferro. As massas bacterianas foram coletadas durante as fases *Log* e estacionária da curva de crescimento da bactéria, para que fosse conduzida a extração das moléculas de membrana com o uso de solventes orgânicos. Este procedimento gerou uma fração denominada antígenos de membrana, rica em glicoproteínas. O perfil proteico variou de acordo com o meio utilizado, sendo que algumas bandas coradas na eletroforese aparecem em muitos meios; identificamos possíveis fatores de virulência *in silico* (*ciuABCDE*, *fagABCD* e *oppBCDA*), já descritas por outros autores; um teste imunoenzimático foi produzido com os antígenos de membrana com especificidade de 100% e sensibilidade de 80%. Portanto foi possível produzir informações importantes para uma futura vacina e produção testes diagnósticos.

**Palavras chave:** *C. pseudotuberculosis*, meios de cultura, quelantes de ferro e proteínas de membrana bacteriana.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	111
<b>1.1. <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i></b> .....	11
<b>1.2. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DO CP</b> .....	12
<b>1.3. PRITEÍNAS COM POTENCIAL VIRULENTO</b> .....	13
<b>1.4. IMPORTANCIA DO FERRO NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA</b> ..	13
<b>1.5. MECANISMOS DE VIRULÊNCIA DO CP</b> .....	15
<b>2. OBJETIVO</b> .....	18
<b>2.1. GERAL</b> .....	18
<b>2.2. ESPECÍFICO</b> .....	18
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	20
<b>3.1. LINHAGENS BACTERIANAS</b> .....	20
<b>3.2. SELEÇÃO DO AGENTE QUELANTE DE FERRO E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	20
<b>3.3. CULTIVO BACTERIANO EM CONDIÇÕES DE ABUNDÂNCIA E RESTRIÇÃO DE FERRO E OBTENÇÃO DA MASSA BACTERIANA</b> .....	21
<b>3.4. EXTRAÇÃO DE COMPONENTES HIDROFÓBICOS DE MEMBRANA COM SOLVENTES ORGÂNICOS</b> .....	25
<b>3.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE C. PSEUDOTUBERCULOSIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS</b>	26
<b>3.6. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO E DO RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO POR IGG</b> .....	27
<b>3.7. ESPECTROMETRIA DE MASSA</b> .....	27
<b>3.8. IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À MEMBRANA PATOGÊNICA</b> .....	29
<b>3.9. DETERMINAÇÃO DE ALVOS COMUNS EM PROTEOMES DE C. PSEUDOTUBERCULOSIS</b> .....	29
<b>3.10. ANÁLISE DE REDES DE ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS FUNCIONAIS</b> .....	30

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 32

**5. PATENTE** ..... 37

**6. ARTIGO CIENTÍFICO 1**..... 50

**Submetido a BMC Microbiology**

**Characterization of pathogenic membrane proteins expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum**

**7. CONCLUSÃO**..... 75

**8. PERSPECTIVAS FUTURAS**..... 77

**9. REFERÊNCIAS** ..... 78

**10. ANEXO**..... 86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A linfadenite caseosa (LC), enfermidade infecciosa causada pelo patógeno *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp), é responsável por significativo grau de perdas econômicas na ovinocaprinocultura. A doença apresenta um caráter crônico, sendo responsável por impactos negativos no ganho de peso e produção de leite, assim como pela desvalorização do couro e condenação de carcaças nos abatedouros de pequenos ruminantes. Além do tratamento com antibióticos ser considerado inviável, a sua erradicação é difícil, visto que está amplamente disseminada nos rebanhos mundiais (Dorella *et al.*, 2006) e até o presente momento nenhum modelo vacinal satisfatório foi produzido para caprinos e ovinos (Bastos *et al.*, 2012).

Vacinas propiciam uma proteção a infecções ao estimular o desenvolvimento de células direcionadas à destruição de um patógeno específico (Handman, 1997; Santos *et al.*, 1999). Entre 1972 e 2011, pelo menos 39 modelos de vacinas contra *C. pseudotuberculosis* foram sugeridos por pesquisadores de todo o mundo. Estes imunógenos envolvem o uso de bacterinas e toxóides neutralizados com formalina, bactérias geneticamente modificadas, antígenos recombinantes e estirpes atenuadas do microrganismo. No entanto, nenhum produto apresentou eficácia satisfatória, oferecendo proteção completa aos animais em um rebanho (Bastos, *et al.*, 2012). Esta lacuna no mercado demonstra a complexidade da elaboração de um imunógeno capaz de ativar todas as vias imunológicas necessárias para conferir proteção aos ovinos e caprinos. Dada essa complexidade, novas abordagens biotecnológicas têm sido usadas pelos pesquisadores para desvendar os mecanismos moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis*.

Embora a doença possa ser diagnosticada através do cultivo microbiológico do material caseoso, uma parte dos animais infectados pode desenvolver granulomas internos, comumente nos pulmões ou linfonodos do mediastino, não expressando sinais clínicos de infecção (Binns *et al.*, 2007). Uma vez estabelecida no rebanho, a erradicação desta doença constitui um passo difícil, tendo em vista a dificuldade no tratamento e a detecção de animais contaminados pelos sinais clínicos tem sua eficiência limitada (Paule *et al.*, 2004; Mohan *et al.*, 2008). Por estes motivos, a prevenção através de vacinação e o diagnóstico da enfermidade em fase precoce

constituem as melhores ações de controle da doença, o que torna a elaboração de vacinas eficazes e de testes de imunodiagnóstico prioridades científicas.

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo denominado CMNR inserido na classe das actinobactérias, no qual também estão presentes *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* onde observa-se algumas semelhanças como: a organização da parede celular baseada num grande complexo polimérico de peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, além de um alto conteúdo Guanina-Citosina no seu genoma (Dorella *et al.*, 2006).

## **1.2. Patogenicidade e virulência do *Cp***

A capacidade de um microrganismo persistir no hospedeiro é conferida por fatores ligados à virulência, que permitem a evasão do sistema imune e a sua proliferação (Kaufmann, 2001).

Do ponto de vista do patógeno a virulência pode ser determinada pelo número de organismos requeridos para estabelecer uma infecção, taxa de crescimento bacteriano, disseminação, persistência crônica e transmissibilidade. Do ponto de vista do hospedeiro a virulência pode ser verificada pela suscetibilidade a infecção, patologia tecidual, severidade dos sintomas da doença, taxa de progressão da doença e frequência de mortalidade (Cosma *et al.*, 2003).

No mecanismo de patogênese, em infecções naturais dos pequenos ruminantes, a *Cp* utiliza como a principal porta de entrada, ferimentos ou pequenas abrasões na superfície da pele (Dorella *et al.*, 2006a; Baird & Fontaine, 2007). Após a entrada, ocorre a formação lesões granulomatosas (Kuria *et al.*, 2001; Baird & Fontaine, 2007; Soares, *et al.*, 2007), à medida que o microrganismo se dissemina, utilizando a via linfática ou sanguínea, as lesões se desenvolvem em órgãos internos; nos linfonodos mediastínicos, nos pulmões, fígado e baço podendo acometer outros órgãos (Baird & Fontaine, 2007). Os granulomas da LC são resultados principalmente da resposta imune do hospedeiro como um mecanismo para conter a disseminação deste microrganismo (Pekelder, 2000). Além da visualização de granulomas é possível identificar em exames laboratoriais nos caprinos e ovinos: anemia, leucocitose com neutrofilia e altos níveis de fibrinogênio, hipoproteinemia ou uma hiperproteinemia por aumento de imunoglobulinas (principalmente IgG) e aumento de Interferon gama (Paule *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que proteínas extracelulares (de superfície) desempenham um papel importante na virulência bacteriana, na capacidade de adesão, invasão celular, adaptação, sobrevivência dentro da célula hospedeira, fuga de células de defesa, além de modular o sistema imune do hospedeiro (Hilbi & Haas, 2012; Schneewind & Missiakas, 2012).

### **1.3. Proteínas com potencial virulento**

Após o completo sequenciamento do genoma deste micro-organismo, estudos *in silico* demonstraram a associação de alguns genes com possíveis mecanismos de virulência, os genes já caracterizados (D'Afonseca *et al.*, 2008) estão atualmente depositados no Genpet (National Center for Biotechnology Information – NCBI). Dentre estes genes, foram registrados quatro genes (*fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*) que compõem o operon *fag ABC*, o qual é responsável pela expressão de proteínas envolvidas na captação de ferro (transportador ABC), as quais contribuem para a persistência bacteriana no hospedeiro animal (Santos *et al.*, 2012; Trost *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2011). Estes genes são regulados pela disponibilidade de ferro do ambiente, sendo melhor expressos em condições de restrição de elemento químico (Billington *et al.*, 2002). Este sofisticado mecanismo foi amplamente descrito em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo possível encontrar diversos artigos publicados sobre as bases moleculares da captação de ferro, e as moléculas envolvidas são comumente denominadas sideróforos (Heinrichs *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001,a-b).

### **1.4. Importancia do ferro no desenvolvimento da doença**

Ferro é essencial para muitos microrganismos e uma etapa crucial no estabelecimento de infecções em animais (Heinrichs *et al.*, 1999; Ganz & Nemeth, 2015). Ele é encontrado em dois estados de oxidação diferentes. A forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), altamente insolúvel, é encontrada na presença de altas concentrações de oxigênio e a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), mais solúvel, encontrada em ambientes em anóxia ou com baixo pH. Sendo utilizado por muitos seres vivos em funções celulares diversas (Andrews *et al.*, 2003; Andrews, 2010; Chu *et al.*, 2010).

O ferro tem uma grande importância para as bactérias, contudo algumas delas possuem a capacidade de se desenvolver e multiplicar em ambiente livre de ferro,



utilizando-se de outros metais, como manganês e cobalto, para desempenhar suas funções metabólicas (Andrews *et al.*, 2003; Smith, 2004).

Partindo do princípio que o ambiente de infecção do hospedeiro apresenta naturalmente uma baixa disponibilidade de ferro, pesquisadores passaram a buscar uma mimetização dessas condições em modelos *in vitro*, de forma que os micro-organismos expressassem os possíveis fatores de virulência que são realmente expressos *in vivo*. Em alguns estudos, a restrição do ferro para micro-organismos em meios de cultura foi alcançada pela suplementação com agentes quelantes, como mesilato de desferroxamina, deferiprona e deferasirox (Maurer *et al.*, 2007; Paradkar *et al.*, 2008); outros estudos buscaram tal mimetismo realizando o cultivo bacteriano diretamente em soro humano e animal ou em soro fetal bovino industrial, os quais são ambientes naturalmente ricos em proteínas quelantes de ferro (Oogai *et al.*, 2011). Contudo em cultivos com *Cp*, ainda não foram relacionadas as características de crescimento, com o que foi expresso pelas bactérias em diferentes condições de cultivo.

O ferro em organismos vivos encontra-se complexado com ácidos orgânicos ou proteínas, além disso, o ferro encontrado no hospedeiro tende a estar em concentração reduzida como estratégia para combater a infecção. Para conseguir captar este metal bactérias patogênicas se utilizam de mecanismos de captação que garantem sua adaptação diante de condições adversas (Andrews *et al.*, 2003; Andrews, 2010; Hood & Skaar, 2012; Ganz & Nemeth, 2015).

Uma das formas mais eficientes para captação de ferro extracelular encontrada por bactérias se dá através da síntese de sideróforos, pequenas biomoléculas, com tamanho de 400 a 1000 Da, que apresentam altíssima afinidade por íon férrico (Chu *et al.*, 2010). A maioria dos sideróforos são sintetizados por peptídeo sintases não-ribossomais (NRPS), as quais são enzimas multimodulares que se assemelham às ácido graxo sintases de tipo I de eucariotos (Chan & Vogel, 2010). Essa via de síntese foi a primeira a ser elucidada e continua sendo a mais importante entre bactérias, sendo responsável pela síntese de muitos dos sideróforos já conhecidos (Chu *et al.*, 2010).

Uma via de síntese de sideróforos, independente de NRPS, são baseados em moléculas como ácidos dicarboxílicos ou amino alcoóis, derivados de aminoácidos. Para todas as bactérias estudadas que apresentaram algum sideróforo sendo sintetizado por essa via, encontrou-se algum gene com alta similaridade a *ciuA* ou *ciuB*, que são proteínas associadas ao transporte de ferro (Barry & Challis, 2009).

O sideróforo, ou qualquer outro complexo férrico transportado para o espaço periplasmático de bactérias Gram negativas, é ligado a uma proteína periplasmática ligante de ferro, que irá transportar o complexo para um transportador ABC cognato localizado na membrana interna. O transportador ABC transfere o complexo férrico para o citoplasma num processo dependente de ATP. No espaço intracelular o sideróforo pode ser degradado ou reciclado posteriormente à retirada do seu átomo de ferro (Chu *et al.*, 2010; Braun & Hantke, 2011).

Em bactérias Gram-positivas, os sideróforos são diretamente transferidos para uma proteína ligante de ferro, a qual transfere o complexo ferro-sideróforo para o transportador ABC localizado na membrana citoplasmática (Andrews *et al.*, 2003; Andrews, 2010; Chu *et al.*, 2010).

O papel de armazenamento de ferro, em bactérias, é desempenhado por ferritinas e proteínas semelhantes à ferritina. Essas proteínas oxidam os íons ferrosos em excesso e armazenam os íons férricos resultantes num sítio não-reativo, no interior das proteínas, ocultando o metal de processos celulares, essa capacidade de armazenamento de ferro é extremamente importante, gerando uma reserva de nutriente e diminuindo os potenciais efeitos tóxicos que o ferro pode desempenhar quando livre em solução (Andrews *et al.*, 2003; Smith, 2004). Existem em bactérias três classes descritas de proteínas com capacidade de armazenamento de ferro: ferritina, bacterioferritina e proteínas ligantes de DNA (Smith, 2004).

A homeostase de ferro é regulada de acordo com a disponibilidade de ferro no meio. Muitos micro-organismos, dependem do equilíbrio entre capturar ferro para crescer e sobreviver e evitar os seus efeitos tóxicos, sendo isto controlado pela proteína Fur (*Ferric uptake regulator*) (Crosa, 1997; Hantke, 2001). Fur controla a expressão de genes ligados à captação e armazenamento deste metal e de genes relacionados a: estresse oxidativo, metabolismo energético e virulência (Litwin & Calderwood, 1993; da Silva Neto *et al.*, 2009; Benjamin *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2010).

### **1.5. Mecanismos de virulência do *Cp*.**

Embora haja uma crescente busca de diagnóstico e profilaxia para a LC, pouco se investigou sobre os mecanismos moleculares da virulência em *Cp*. Nos últimos 20 anos, dois determinantes da virulência foram bem caracterizados: a exotoxina fosfolipase D (*pld*) e os lipídeos tóxicos da parede celular, também denominados de

ácidos corinomicólicos. A *pld* é considerada como o principal fator de virulência desta bactéria (Lipsky *et al.*, 1982; Hodgson *et al.*, 1999), constituindo um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina da membrana de células de mamíferos (Carne & Onon, 1978; Coyle & Lipsky, 1990; McNamara *et al.*, 1995); dessa forma, esta exotoxina contribui para a dispersão do micro-organismo do sítio inicial de infecção para sítios secundários dentro do hospedeiro (Hodgson *et al.*, 1992; Williamson, 2001). Por outro lado, os ácidos corinomicólicos são lipídeos de superfície de *Cp* que contribuem para a patogênese da doença (Hard, 1972), de forma que linhagens mais virulentas possuem mais lipídeos que as linhagens atenuadas (Jolly, 1966). Esta camada lipídica representa uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos de macrófagos, além de permitir a aderência dos micro-organismos e promover uma citotoxicidade local (Muckle & Gyles, 1982; Alves & Pinheiro, 1997).

Dentre os avanços científicos gerados nessa área, pesquisas recentes já registraram a existência de genes e fatores de virulência regulados pela disponibilidade de ferro, de forma que o perfil de expressão gênica e o proteoma bacterianos são alterados como resposta à restrição férrica. (Carpenter *et al.*, 2009; Cornelis, 2010; Jones & Wildermuth, 2011). A partir destas modificações, novos fatores de virulência associados ao metabolismo do ferro, patogênese bacteriana e persistência do patógeno no hospedeiro foram descobertos em *Corynebacterium diphtheriae* (Schmitt, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Cronjé *et al.*, 2005; Rodriguez & Smith, 2006), *Mycobacterium avium* (Janagama *et al.*, 2010), *Rhodococcus equi* (Boland & Meijer, 2000; Barga *et al.*, 2011), *Francisella tularensis* (Lenco *et al.*, 2007) e *Chlamydomphila pneumoniae* (Maurer *et al.*, 2007), dentre outros micro-organismos intracelulares.

Na busca de marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico precoce e no tratamento de várias doenças, muitos estudos têm focado em alterações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos envolvidos em processos celulares importantes (Barbosa *et al.*, 2012). O proteoma são: os produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, e os complexos formados por essas biomoléculas (Ahrens, *et al.*, 2010). Ele é dinâmico e seu perfil se modifica de acordo com o status fisiológico e as fases da diferenciação celular (Jensen, 2004). O termo proteômica refere-se ao estudo das moléculas responsáveis por controlar os processos biológicos (Valledor & Jorin, 2011), avaliando suas variações

moleculares dentro de uma população, quantidades, mudanças em resposta ao ambiente e suas interações.

Considerando a demanda mundial de soluções para o controle da linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos e a escassez de conhecimento sobre os fatores de virulência de *Cp*, faz-se necessária a realização de estudos voltados para compreensão dos mecanismos de patogênese do micro-organismo e suas moléculas associadas. Nesse sentido, ensaios *in vitro* de crescimento deste micro-organismo sob condições de restrição de ferro e em soro animal podem contribuir para a expressão de um novo perfil proteico que podem vir a ser fatores de virulência, de forma que moléculas fundamentais à patogênese e ainda desconhecidas possam ser identificadas e caracterizadas e, posteriormente, utilizadas na elaboração de novos modelos vacinais e imunodiagnósticos.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar as variáveis moleculares associadas às condições de crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes meios de cultura, com e sem adição de agente quelante de ferro.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência dos agentes quelantes mesilato de desferroxamina, deferiprona e deferasirox sobre a curva de crescimento das linhagens T1 e VD57 de Cp em MQD (Meio Quimicamente Definido. Moura-Costa *et al*, 2002).
2. Cultivar as linhagens T1 (baixa virulência) e VD57 (alta virulência) de Cp em caldo BHI (Brain Heart Infusion), MQD (Meio Quimicamente Definido. Moura-Costa *et al*, 2002), MQD suplementado com ferro, meio RPMI, meio RPMI suplementado com soro ovino e SFB sob condições de abundância e restrição de ferro.
3. Obter a massa bacteriana de cada tratamento experimental em dois momentos distintos da curva de crescimento, na fase Exponencial e na fase Estacionária.
4. Extrair as glicoproteínas de membrana das massas bacterianas obtidas de Cp.
5. Caracterizar as glicoproteínas por espectrometria de massas.
6. Comparar qualitativamente e quantitativamente a expressão de glicoproteínas de membrana do Cp de linhagens de baixa e alta virulência, cultivados em caldo BHI, MQD, MQD suplementado com ferro, meio RPMI, meio RPMI suplementado com soro ovino e SFB e sob condições de abundância e restrição de ferro.

7. Cultivar linhagens T1 e VD57 em meio de cultura produzido a partir de material biológico de ovinos, na tentativa de cultivo *in vitro* em um meio que se aproxime ao máximo das condições *in vivo*.
8. Apontar potenciais fatores de virulência que venham a servir como possíveis alvos vacinais e para o diagnóstico de Cp.
9. Padronizar processo de extração de moléculas de superfície de bactérias Gram positivas.
10. Avaliar a possível padronização de um novo meio de cultura.
11. Produzir teste diagnóstico.

### 3. Metodologia

#### 3.1. *Linhagens bacterianas*

Neste experimento foram utilizadas duas linhagens bacterianas da Coleção de Microrganismos do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. A linhagem denominada T1 foi isolada a partir de granuloma em linfonodo caprino com lesão, na região de Santa Luz na Bahia. Esta linhagem foi considerada como de baixa virulência por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que a demais, assim como por não provocar a morte de camundongos BALB/c na dose de  $10^7$  UFC, induzindo apenas o desenvolvimento de lesões discretas. A outra linhagem foi isolada na região de Juazeiro, estado da Bahia, a partir de material caseoso de linfonodo de caprino, sendo catalogada como VD57. A confirmação da identificação foi feita através de coloração de Gram, morfologia colonial, hemólise sinérgica com *R. equi*, produção de urease, produção de catalase e posteriormente confirmada através de *kit* API Coryne (BioMérieux). Ambas as linhagens citadas, assim como as demais amostras de *C. pseudotuberculosis* isoladas a partir de granulomas superficiais de caprinos e ovinos do interior do estado da Bahia, são mantidas em glicerol em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2. *Seleção do agente quelante de ferro e estabelecimento da curva de crescimento por citometria de fluxo*

Foram realizados 5 grupos de cultivos da linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis* para determinação da curva de crescimento sob influência dos agentes quelantes. Como meio de cultura foi utilizado o MQD (meio quimicamente definido) no volume de 50 ml em tubos Falcon, suplementado com Tween 80 na proporção de 0,5%, o que possibilita o crescimento segregado do microrganismo. Todos os cultivos foram realizados em triplicata, mantidos a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação por 72 horas, sendo os grupos experimentais divididos da seguinte forma: G1 (cultivo controle) inoculação em MQD puro; G2, inoculação em MQD suplementado com  $50\ \mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ; G3, inoculação em MQD suplementado com  $25\ \mu\text{M}$  de mesilato de desferroxamina; G4, inoculação em MQD suplementado com  $50\ \mu\text{M}$  de mesilato de desferroxamina; G5, inoculação em MQD suplementado com  $75\ \mu\text{M}$  de mesilato de desferroxamina; G6

inoculação em MQD com 10 mM deferasirox; G7 inoculação em MQD com 20 mM deferasirox; G8 inoculação em MQD com 40  $\mu$ M deferasirox.

O monitoramento da curva de crescimento foi realizado por citometria de fluxo, conforme estabelecido por Sampaio (2012). Foram retirados 3,0 ml da cultura nos tempos de 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e 72 horas após a inoculação. As bactérias foram lavadas em solução salina 0,9% e centrifugadas por 4 minutos a 8.000g, para posterior descarte do sobrenadante. Foi adicionado SYBR Safe™ (corante que se intercala a fita dupla de DNA, não dependendo de permeabilidade da membrana), procedendo-se a incubação por 20 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. Foi realizada nova lavagem para retirada do excesso dos reagentes, e o *pellet* bacteriano foi ressuspenso em solução de iodeto de propídio, visando a verificação da permeabilidade celular. Para a realização da contagem absoluta de microrganismos em suspensão pelo citômetro de fluxo foram utilizados tubos *TruCount* (Becton Dickson, EUA), contendo microesferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constante em cada lote. Após a contagem, foi aplicada a seguinte fórmula aos resultados: Bactérias totais = (Nºbeads eventos bacterias / Nº de beads A+B) X Nº de Beads por  $\mu$ l.

Nesta etapa do experimento foram definidas as fases lag, log estacionária e de declínio na curva de crescimento do microrganismo. Com base na influência exercida pelos agentes quelantes sobre as curvas de crescimento, foi definido o melhor quelante para utilização nas etapas seguintes da pesquisa.

### ***3.3. Cultivo bacteriano em condições de abundância e restrição de ferro e obtenção da massa bacteriana***

As condições de cultivo aplicadas estiveram em conformidade com os trabalhos de Lenco *et al.* (2007) (realizado com *Francisella tularensis*) e Oogai *et al.* (2011) (realizado com *Staphylococcus aureus*), sofrendo apenas pequenas adaptações. Foram cultivadas as linhagens T1 (baixa virulência) e VD57 (alta virulência) de *C. pseudotuberculosis* em 250 ml de caldo BHI, Soro Fetal Bovino (SFB), MQD (composição Quadro 1), MQD suplementado com ferro, RPMI (composição Quadro 2), RPMI suplementado com soro ovino e com o meio produzido a partir de material biológico ovino. Todos sob agitação (200 rpm) em *shaker* automático por 48 horas; os meios foram utilizados íntegros (ricos em ferros) ou suplementados com o agente



quelante definido na etapa anterior, para o respectivo estabelecimento de ambiente restrito em ferro.

Os cultivos foram realizados em duplicatas; uma primeira replicata foi retirada do *shaker* durante o período intermediário da fase Log de crescimento (definido na etapa anterior); a segunda replicata foi retirada do *shaker* no período intermediário da fase estacionária (definido na etapa anterior). Os meios foram centrifugados por 40 minutos a 4000g a 4°C para retirada do sobrenadante das culturas.

Posteriormente, e os pellets bacterianos foram lavados por 3 vezes em PBS Tween 0,05%.

No Quadro 3 estão descritos os grupos experimentais.

**Quadro 1:** Composição MQD em g/L.

<b>Tampão Fosfato: 0,067 M</b>		<b>Aminoácidos</b>	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 72%	Arginina	0,2528
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	12,93 g	Cistina	0,0480
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)	2,55 g	Histidina	0,0840
NH <sub>4</sub> Cl	1,00 g	Isoleucina	0,1050
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g	Leucina	0,1048
MgSO <sub>4</sub>	0,20 g	Lisina	0,1450
Glicose	12,00 g	Metionina	0,0302
Tween 80	1,00 g	Fenilalanina	0,0660
		Treonina	0,0952
<b>Vitaminas</b>		Triptófano	0,0204
Pantotenato de Ca	0,0010	Tirosina	0,0720
Cloreto de Colina	0,0010	Valina	0,0936
Ácido Fólico	0,0010	Alanina	0,0356
Inositol	0,0020	Asparagina	0,0528
Niacinamida	0,0020	Ácido Aspártico	0,0532
Piridoxal	0,0010	Ácido Glutâmico	0,0532
Riboflavina	0,0001	Glicina	0,0300
Tiamina HCl	0,0010	Serina	0,0420

**Quadro 2:** Composição do RPMI

<b>SAIS INORGÂNICOS</b>	<b>mg/L</b>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100	L-triptofano	5
KCL	400	L-prolina	20
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100	L-tirosina	28
NaCl	6.000,00	L-serina	30
NaHCO <sub>3</sub>	2.000,00	L-valina	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	800	L-treonina	20

		<b>VITAMINAS</b>	<b>mg/L</b>
<b>AMINOÁCIDOS</b>	<b>mg/L</b>	Biotina	0,2
L-arginina.HCL	200	pantotenato de cálcio	0,25
L-asparigina.H2O	50	cloreto de colina	3
L-ácido aspártico	20	ácido fólico	1
L-cistina	50	inositol	35
L-ácido glutâmico	20	nicotinamida	1
L-glutamina	300	ácido p-aminobenzóico	1
glicina	10	piridoxina.HCL	1
L-histidina.HCL.H2O	15	riboflavina	0,2
L-hidroxi prolina	20	tiamina.HCL	1
L-isoleucina	50	vitamina B12	0,005
L-leucina	50		
L-lisina.HCL	40	<b>OUTROS COMPONENTES</b>	<b>mg/L</b>
L-metionina	15	glicose	2.000,00
L-fenilalanina	15	glutathione	1
		vermelho de fenol	5

**Quadro 3:** Grupos experimentais.

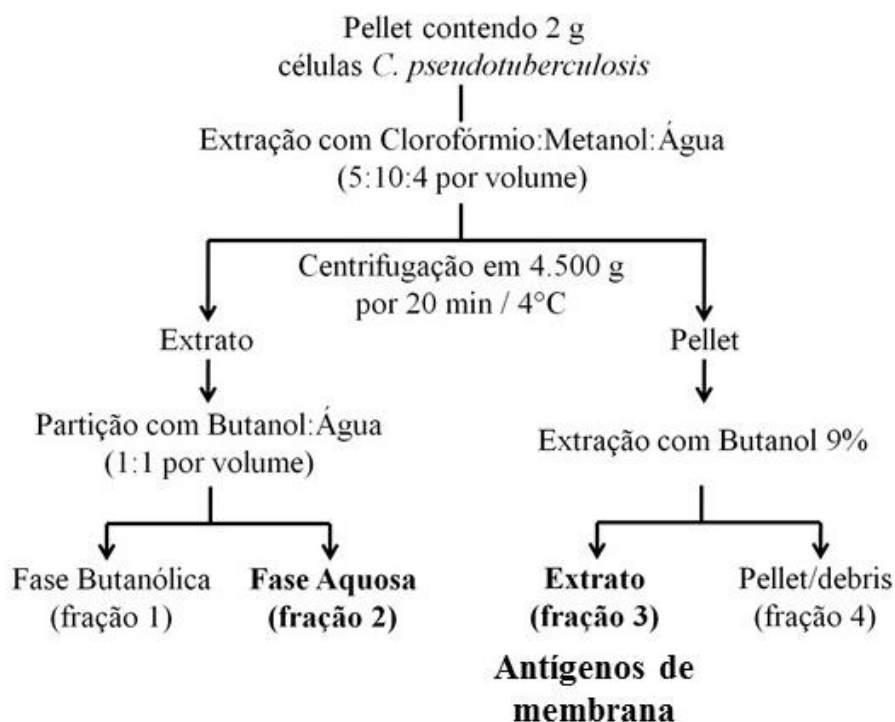
MEIO DE CULTURA	GRUPO	QUELANTE	CEPA Cp
RPMI	25	-	-
	26	-	-
	27	-	VD 57
	28	-	VD 57
	29	-	T1
	30	-	T1
	31	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	32	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	33	DFX 25 $\mu$ mol	T1
	34	DFX -25 $\mu$ mol	T1
	BHI	35	-
36		-	-
37		-	VD 57
38		-	VD 57
39		-	T1
40		-	T1
41		DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
42		DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
43		DFX 25 $\mu$ mol	T1
44		DFX 25 $\mu$ mol	T1
MQD + FERRO	45	-	-
	46	-	-
	47	-	VD 57
	48	-	VD 57
	49	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57

	50	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	51	DFX 50 $\mu$ mol	VD 57
	52	DFX 50 $\mu$ mol	VD 57
	53	DFX 75 $\mu$ mol	VD 57
	54	DFX 75 $\mu$ mol	VD 57
	55	-	T1
	56	-	T1
	57	DFX 25 $\mu$ mol	T1
	58	DFX 25 $\mu$ mol	T1
	59	DFX 50 $\mu$ mol	T1
	60	DFX 50 $\mu$ mol	T1
	61	DFX 75 $\mu$ mol	T1
	62	DFX 75 $\mu$ mol	T1
RPMI + FERRO	63	-	-
	64	-	-
	65	-	VD 57
	66	-	VD 57
	67	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	68	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	69	-	T1
	70	-	T1
	71	DFX 25 $\mu$ mol	T1
	72	DFX 25 $\mu$ mol	T1
RPMI + SORO	73	-	-
	74	-	-
	75	-	VD 57
	76	-	VD 57
	77	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	78	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	79	-	T1
	80	-	T1
	81	DFX 25 $\mu$ mol	T1
	82	DFX 25 $\mu$ mol	T1
MQD	83	-	-
	84	-	-
	85	-	VD 57
	86	-	VD 57
	87	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	88	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
ADULTAL	89	-	-
	90	-	-
	91	-	VD 57
	92	-	VD 57
	93	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	94	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
SORO FETAL BOVINO	95	-	-
	96	-	-
	97	-	VD 57

	98	-	VD 57
	99	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	100	DFX 25 $\mu$ mol	VD 57
	101	-	T1
	102	-	T1
	103	DFX 25 $\mu$ mol	T1
	104	DFX 25 $\mu$ mol	T1

### **3.4. Extração de componentes hidrofóbicos de membrana com solventes orgânicos**

As massas bacterianas das cepas T1 e VD57 foram ajustadas para o peso de 1 g e resuspendidas em 10 ml de solução composta por clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) e sonicadas a 60 Hz (cinco ciclos de 60 s). O material foi submetido a extração três vezes com 35 ml de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) por quatro horas sob agitação, seguida de centrifugação a 4.500 g por 20 min a 4°C. Para a primeira partida da desta extração foram adicionados apenas 25 ml da solução para totalizar os 35 ml. Após as centrifugações, os sobrenadantes resultantes foram reunidos e o volume final foi reduzido por rota-evaporação. Esta solução final concentrada foi submetida à extração com 30 ml butanol-água (1/1, v/v) por uma hora, o que resultou em uma fase butanólica e uma fase aquosa, as quais foram nomeadas F1 e F2, respectivamente; a fração F2 passou por este procedimento mais duas vezes, e as soluções finais foram reunidas e rota-evaporadas até se alcançar o volume de 6 ml. O sedimento obtido após a extração de clorofórmio-metanol-água foi seco sob gás N<sub>2</sub> e extraído três vezes com 35 ml de 9% butanol em água por 3 h sob agitação, seguida de centrifugação a 4.500 g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram reunidos e rota-evaporados até se alcançar o volume de 8 ml, sendo esta fração denominada de antígenos de membrana. Esta fração é formada principalmente pelas glicoproteínas de membrana do microrganismo, objeto principal do presente estudo. A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando soro albumina bovina como padrão. A Figura 1 apresenta um fluxograma simplificado do protocolo de extração.



**Figura 1.** Fluxograma da estratégia utilizada para o fracionamento dos componentes estruturais do *C. pseudotuberculosis* com base em suas características de hidrofobicidade.

### 3.5. Caracterização molecular das proteínas de membrana de *C. pseudotuberculosis* por espectrometria de massas

Para a identificação da estrutura das glicoproteínas de membrana de *C. pseudotuberculosis*, foi realizada espectrometria de massas das frações de antígenos de membrana. Este procedimento foi realizado em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-BA), na Plataforma de Espectrometria de Massas. As amostras foram previamente digeridas por tripsina (1:50), a solução peptídica foi encaminhada para passagem no aparelho ESI-Q-Tof (Waters) a 5mL/min em modo positivo de aquisição de dados, com voltagem capilar estabelecida em 2.3kV. Os espectros de massas obtidos a partir dos peptídeos foram analisados através do software PLGS (ProteinLink Global Server); as sequências de aminoácidos dos peptídeos foram alinhadas com sequências depositadas na base de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information). Após as comparações com a base de dados, foram previstas as possibilidades de proteínas com base no grau de homologia com proteínas já catalogadas para outros microrganismos, principalmente para bactérias

filogeneticamente relacionadas com o *C. pseudotuberculosis*, como o *Rhodococcus equi* e o *Mycobacterium tuberculosis*.

### **3.6. Caracterização do perfil eletroforético e do reconhecimento antigênico por IgG**

As frações obtidas foram submetidas ao procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE); posteriormente, os géis foram corados utilizando-se nitrato de prata ou eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose para realização do *Western Blot*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS-T acrescido de 5% de soroalbumina bovina por 12 horas a 4°C; em seguida, foi incubada a 37°C por 1 h com um *pool* de amostras de soro de ovinos com infecção confirmada por *C. pseudotuberculosis* diluído 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado em pó. Foi utilizado um *pool* de soros de animais confirmadamente negativos para a infecção por *C. pseudotuberculosis* como controle negativo dos testes. Foram utilizados os anticorpos de detecção anti-IgG de ovinos conjugados com peroxidase (Bethyl) diluídos em PBS-T na proporção de 1:250, sendo também incubados por uma hora. A revelação foi conduzida com cromógeno 4-cloro-1-naftol adicionado de substrato peróxido de hidrogênio. Como referencial de peso molecular, foi utilizada uma solução padrão de peso molecular pré-corada (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen).

### **3.7. Espectrometria de massa**

Por ser o meio padronizado e comercial que mais se aproxime ao modelo *in vivo* somente as amostras em sextuplicata dos antígenos de membrana do SFB passou por esta etapa. Para minimizar a variação biológica na identificação de proteína, as replicatas dos extratos de proteína foram reunidos para homogeneização e, em seguida, divididos em seis repetições iguais para a análise de espectrometria de massa (Eshghi *et al.*, 2009). Antes da análise de espectrometria de massa, alíquotas de 150 µg em proteína de cada repetição foram sujeitas a precipitação de acetona durante a noite a -20 ° C para remover quaisquer contaminantes. Os precipitados de proteína foram centrifugados a 13000 rpm durante 20 minutos a 4 ° C e após a remoção da acetona, os peletes resultantes foram ressuspensos em 100 µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50 mM, pH 9,7). O material foi reduzido por incubação com 5 µL de ditioneitol 200 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

100 mM a 95 ° C durante 5 min e alquilado com 4 µL de iodoacetamida 500 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM durante 45 min à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com 5 µL de ditioneitol 200 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM. A digestão foi feita utilizando tripsina de grau de sequência (Promega Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) a 1/50 (p / p) de tripsina / proteína a 37° C durante a noite. Os péptidos tríticos foram dessalinizados utilizando colunas de Spin Pierce C18 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) seguindo as instruções do fabricante (Santos et al., 2003).

A separação do peptídeo foi realizada por cromatografia líquida (nanoACQUITY UPLCTM, Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Foi feita a digestão com tripsina dos peptídeos (3 µL), foram carregados a uma taxa de fluxo de 5 µL / min numa coluna de armadilha Symmetry C18 (Waters Corporation) durante 2 minutos, utilizando 0,1% de ácido fórmico (FA) / 3% de acetonitrilo (ACN) e água como eluente. Os peptídeos foram eluídos da coluna de armadilha com um gradiente escalonado utilizando o solvente B (0,1% de FA em ACN) e separados numa coluna BEH 130 C18 (Waters Corporation) a uma taxa de fluxo de 0,6 µL/ min. A detecção de massa de peptídeos foi realizada num espectrómetro de massa híbrido de quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF micro, Micromass, Alliedscienpro, Quebec, Canadá) equipado com uma fonte de pulverização Z de nanoeletrospray. A análise de dados dirigidos, adquirida no modo de pesquisa, foi processada utilizando MassLynx (v 4.1, Waters Corporation) e os arquivos brutos do micro Q-TOF (dados MS-MS) foram convertidos para o formato PKL (lista de picos); os arquivos das seis repetições foram mesclados em um arquivo para a pesquisa em bancos de dados.

Pesquisas empregando dados de MS-MS foram realizadas usando o software open source X! Tandem ([thegpm.org/tandem](http://thegpm.org/tandem)), que conta o número de íons correspondentes e, em seguida, calcula uma pontuação usando os íons correspondentes e suas intensidades. A pesquisa é feita interativamente: somente as proteínas que têm pelo menos um peptídeo identificado em uma iteração, são pesquisadas em interações subsequentes. Esta busca interativa pode ser usada para acelerar e aumentar a sensibilidade da identificação. (Craig & Beavis, 2003; Craig & Beavis, 2004). Os parâmetros de pesquisa incluíram o conjunto de entrada de enzima para tripsina, tolerância peptídica de 100 ppm, tolerância de massa de fragmento de 1,2 Da e o número máximo de clivagens perdidas para 1. A metilação de carbamido de cisteína e a oxidação de metionina foram definidas como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Os resultados da pesquisa foram validados através do log da pontuação

E. As combinações de espectro peptídico foram consideradas significativas quando o valor de expectativa de Log relatado por X! Tandem era menor que -3, o que significa que a probabilidade de um peptídeo corresponder a um falso positivo é menor que 0,005. Apenas as proteínas que tinham pelo menos dois peptídeos identificados foram consideradas para análise posterior.

### **3.8. Identificação *in silico* de proteínas associadas à membrana patogênica**

As proteínas identificadas foram submetidas à predição de localização subcelular no servidor web CELLO2GO ([cello.life.nctu.edu.tw/cello2go](http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go)), que combina as abordagens CELLO de previsão de localização e de homologia de BLAST, bem como informações de ontologia genética (GO) para mapear a superfície celular e proteínas citoplasmáticas. A precisão global para a predição de localização subcelular obtida pelo CELLO2GO é de 99,4% para as bactérias Gram-positivas, com um valor E ajustado em 0,001 (Yu *et al.*, 2013). Todas as proteínas foram também submetidas à predição de topologia de proteínas no servidor web TOPCONS ([topcons.cbr.su.se](http://topcons.cbr.su.se)), que identifica as regiões transmembranar e peptídeo sinal e gera um resultado de consenso. O desempenho de previsão de TOPCONS tem uma precisão de 87% (Tsirigos *et al.*, 20015).

A predição de proteínas com potencial patogênicas foi realizada usando o servidor web MP3 ([metagenomics.iiserb.ac.in/mp3](http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3)), que utiliza uma combinação de Máquinas de Suporte Vector (SVM) e Hidden Markov Model (HMM) para identificar sequências de aminoácidos e domínios de proteína de fatores de virulência. O programa permite ao usuário analisar grandes quantidades de dados simultaneamente e o uso de um valor limite de -0,2 fornece altos níveis de sensibilidade (92%), especificidade (100%) e precisão (96%) (Gupta *et al.*, 2014).

Os resultados da predição foram comparados e a seleção de proteínas como alvos para outras predições seguiu os critérios de serem classificadas como proteínas extracelulares, de parede celular ou de membrana, apresentar um péptido sinal ou pelo menos uma hélice transmembranar e ser classificado como patogênico.

### **3.9. Determinação de alvos comuns em proteomas de *C. pseudotuberculosis***



De forma a identificar as proteínas alvo com potencial patogênico associadas à membrana que estão possivelmente presentes em todas as cepas sequenciadas de Cp, foi realizada uma análise de agrupamento utilizando o servidor web CD-HIT ([weizhongli-lab.org/cdhit\\_suite/cgi-bin/index.cgi](http://weizhongli-lab.org/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi)). O CD-HIT utiliza a comparação de identidade das sequências classificadas por comprimento decrescente, em que a sequência mais longa é comparada com as restantes utilizando um determinado limiar. Para este estudo, foi estabelecido um nível de 90% de identidade (Huang *et al.*, 2010). Os proteomas foram obtidos a partir de UniProtKB ([uniprot.org](http://uniprot.org)) no formato FASTA e as estirpes não redundantes (C231, Cp267 e E19) foram selecionadas para avaliação. Como critério, se uma proteína alvo não estava presente num dos proteomas representativos era excluída da análise posterior. Uma vez que todas as proteínas foram agrupadas por similaridade, uma sequência representativa de cada agrupamento foi utilizada para construir um novo arquivo FASTA para realizar outras possíveis redes de associações funcionais de proteínas, utilizando códigos de acesso recuperados a partir do proteoma de referência UniProt *C. pseudotuberculosis* C231.

### **3.10. Análise de redes de associação de proteínas funcionais**

As proteínas alvo selecionadas foram submetidas a uma análise de interação proteína-proteína utilizando a ferramenta de busca para a recuperação de Genes / Proteínas Interagindo (STRING), versão 10.0 ([string-db.org](http://string-db.org)), que compreende a proteína física (direta) e funcional (indireta) conhecida e prevista, derivadas por técnicas experimentais e computacionais. O servidor aplica um algoritmo de criação de perfil filogenético que integra interações de similaridade de sequência de 2031 organismos para realizar a predição de consulta (Franceschini *et al.*, 2015). STRING em sequências múltiplas foi utilizado, e somente as interações com altos níveis de confiança (> 0,700) foram mantidas, conforme recomendado pelos autores (Von Mering *et al.*, 2005). Para caracterizar as possíveis vias metabólicas nas quais as proteínas patogênicas alvo estão envolvidas, um enriquecimento funcional da rede gerada foi realizado permitindo que o servidor String incluísse interatores protéicos estratégicos do proteoma Cp para completar as principais redes (Szklarczyk *et al.*, 2015). No presente estudo, foi construída uma rede de interação com todo o conjunto da proteína alvo, com o número máximo de interações configurado em 160 proteínas (10 interações por proteína alvo). A rede enriquecida foi automaticamente comparada e calibrada em relação aos

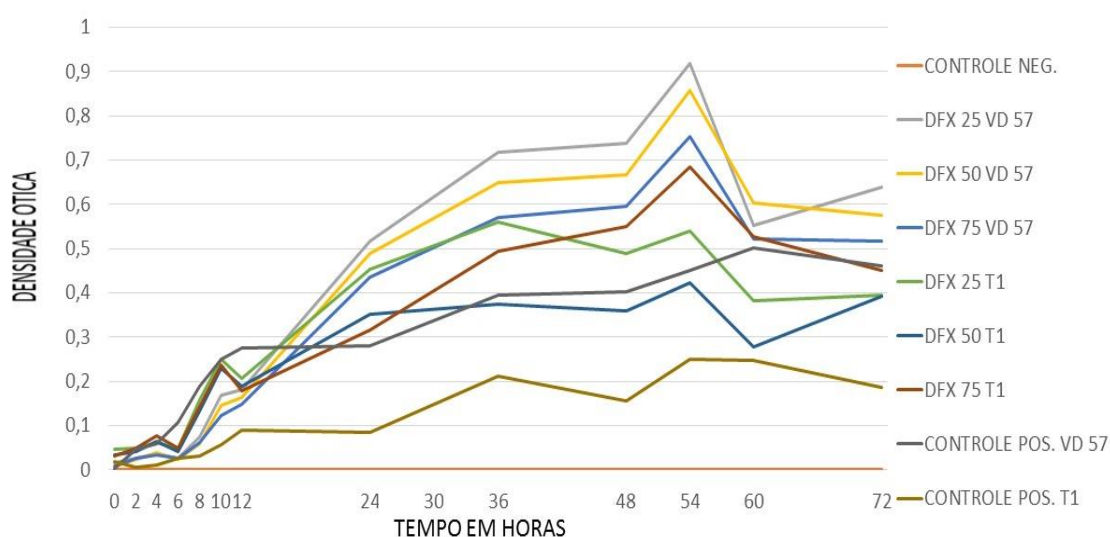
conhecimentos prévios, utilizando os agrupamentos funcionais de alto nível fornecidos pelos mapas de percurso KEGG e os mapas da via KEGG final envolvendo as proteínas alvo patogénicas. Para avaliar a importância de cada nó de proteína alvo dentro da rede, cada nó foi removido dos nós de entrada um a um e a variação no coeficiente de agrupamento e enriquecimento funcional foram analisados, conforme descrito anteriormente (Raman *et al.*, 2008).

#### 4. Resultados e Discussão

Em infecções, o hospedeiro não libera com facilidade ferro para os microorganismos (Andrews *et al.*, 2003; Andrews, 2010; Hood & Skaar, 2012; Ganz & Nemeth, 2015). Assim, mimetizar tais condições usando quelantes de ferro, em diferentes meios de cultura, sendo observadas algumas diferenças nas curvas de crescimento bacteriano e na expressão proteica, observado no SDS-PAGE.

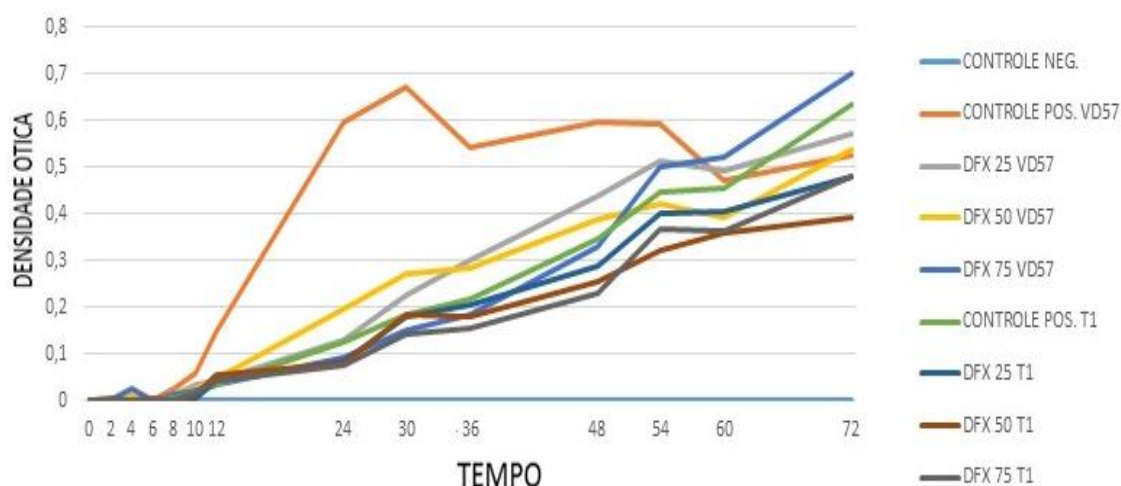
Primeiramente, padronizamos quais as concentrações dos quelantes seriam utilizadas, como está descrito na metodologia grupos G1 a G7. Em todos os pontos de coleta da curva de crescimento fizemos esfregaço corado pelo GRAM, para avaliar as características morfotintoriais, onde não observamos nenhuma possível contaminação.

O Deferasirox (DFS -  $C_{25}H_{48}N_6O_8$ ) possui um excipiente que deixa o meio de cultura turvo o que impossibilitou a leitura no densitômetro óptico, assim não foi possível utilizá-lo no experimento. Na Figura 1 é possível observar que nas culturas com menor concentração de quelante as bactérias cresceram mais, a medida que aumenta a concentração o crescimento bacteriano diminuiu, contudo o quelante favoreceu o crescimento bacteriano quando comparado ao meio de cultura somente com a cepa (CONTROLE POS.), possivelmente por possuir em sua composição grande quantidade de carbono.



**Figura 1:** Curva de crescimento testando diferentes concentrações do quelante Mesilato de Deferroxamina (DFX), em meio quimicamente definido (MQD), frente as duas cepas de Cp testadas, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.

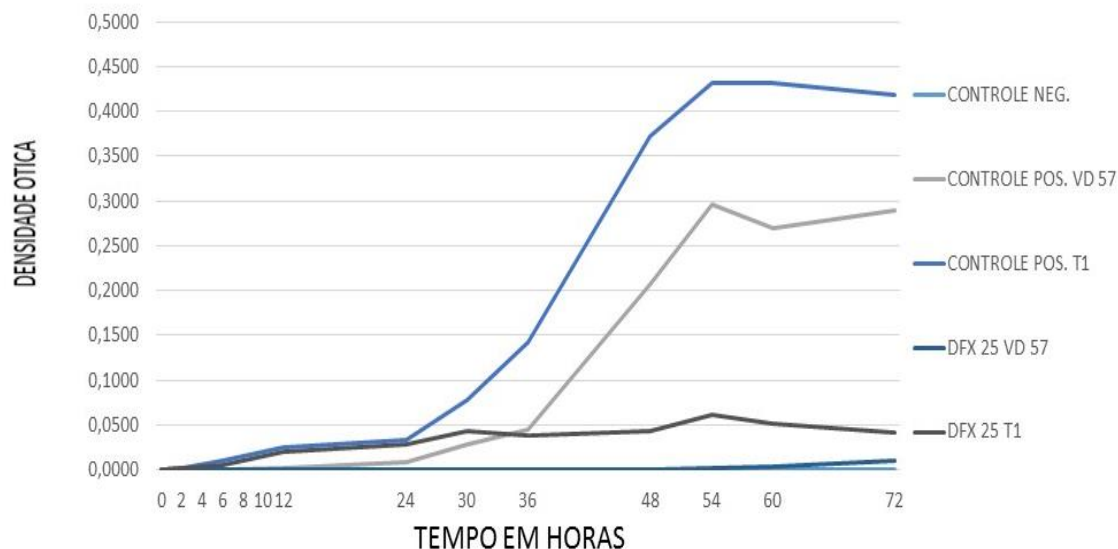
Fizemos curvas de crescimento com os diferentes meios de cultura, com e sem o uso do DFX e eletroforese me SDS PAGE de todos os grupos sendo que alguns coletamos material nas fases logarítmicas e estacionárias. Para avaliarmos melhor a influência do ferro para o Cp, suplementamos o MDQ com 3,15g/L de cloreto de ferro hexahidratado (Abdala, 2011; Carin, 2012), grupos de 45 a 62, observamos que o quelante fez com que a fase log ficasse mais longa (Figura 3), justificado pelo uso do quelante que mimetiza a condição *in vivo*, onde capta o ferro no meio através de uma possível via que é a síntese de sideróforos (Chu *et al.*, 2010). A fase log fica mais longa por que a bactéria tem menos ferro disponível, é possível que expresse mais sideróforos nestas condições, onde foi observado que a presença de ferro estimulou o crescimento com o quelante. Assim como a cepa VD 57 tenha maior capacidade de captar ferro.



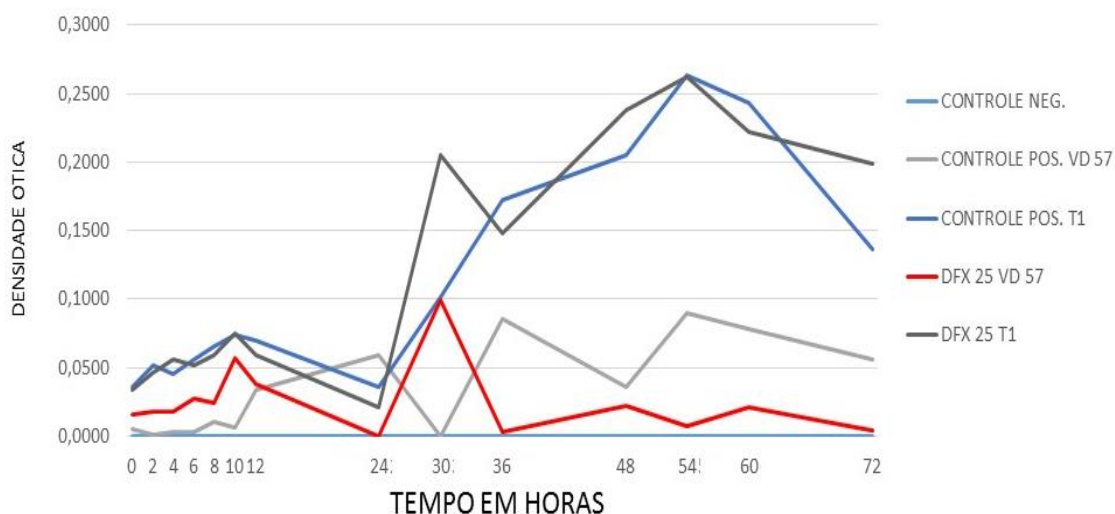
**Figura 3:** Curva de crescimento testando diferentes concentrações do quelante Mesilato de Deferroxamina (DFX), em meio quimicamente definido (MQD) suplementado com cloreto de ferro hexahidratado, frente as duas cepas de Cp testadas, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.

Quando em grandes concentrações o Ferro pode afetar o processo de digestão microbiana (Chen *et al.*, 2008), possivelmente este seja um fator que está agindo nos meios que com maiores proporções do metal.

No meio RPMI suplementado com cloreto de ferro hexahidratado as cepas não cresceram. Contudo quando o RPMI foi suplementado com soro ovino observamos que o quelante inibiu drasticamente o crescimento bacteriano Figura 5, o mesmo ocorreu com o meio não suplementado, Figura 6.



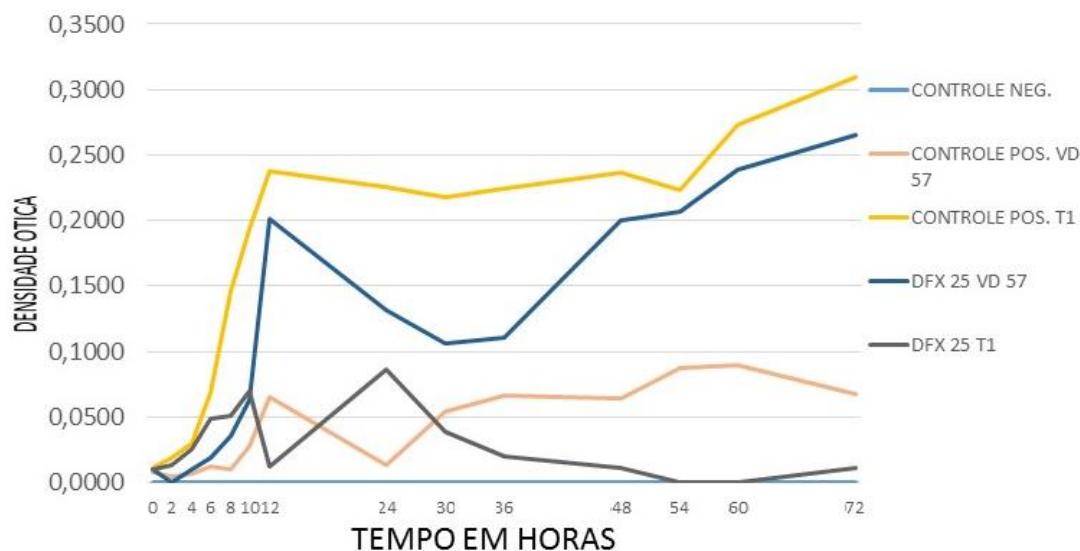
**Figura 5:** Curva de crescimento testando RPMI suplementado com soro ovino associado ao quelante, frente as duas cepas de Cp testadas, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.



**Figura 6:** Curva de crescimento testando RPMI associado ao quelante, frente as duas cepas de Cp testadas, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.

Com base em todos os testes realizados com RPMI as cepas testadas não tiveram um bom crescimento no meio.

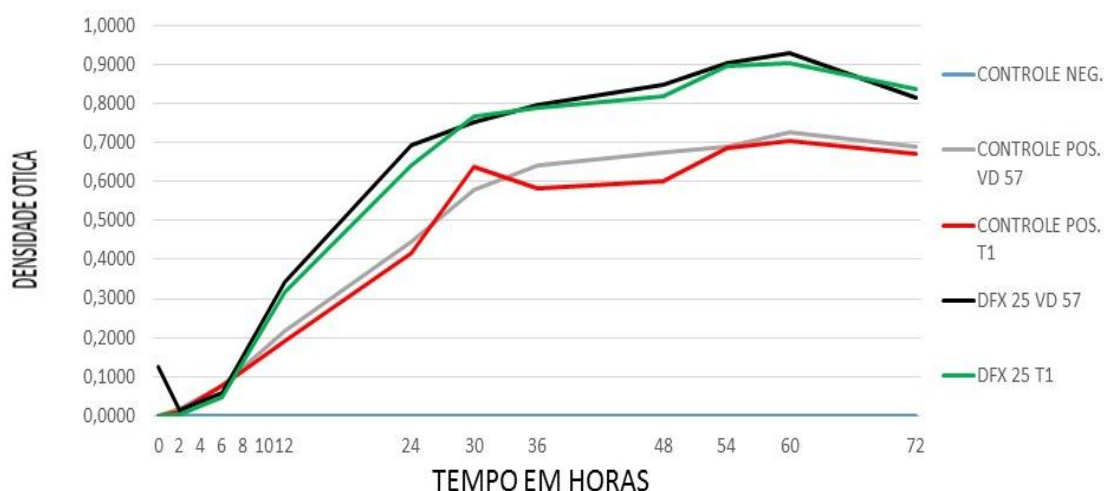
Testando o meio de cultura mais usado em nossa linha de pesquisa (BHI), associado ao quelante, é possível ver na Figura 9 que a cepa T1 quando em contato como DFX não conseguiu se desenvolver, porem a VD 57 teve um crescimento maior que o seu grupo controle.



**Figura 9:** Curva de crescimento testando BHI associado ao quelante, frente as duas cepas de Cp testadas, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.

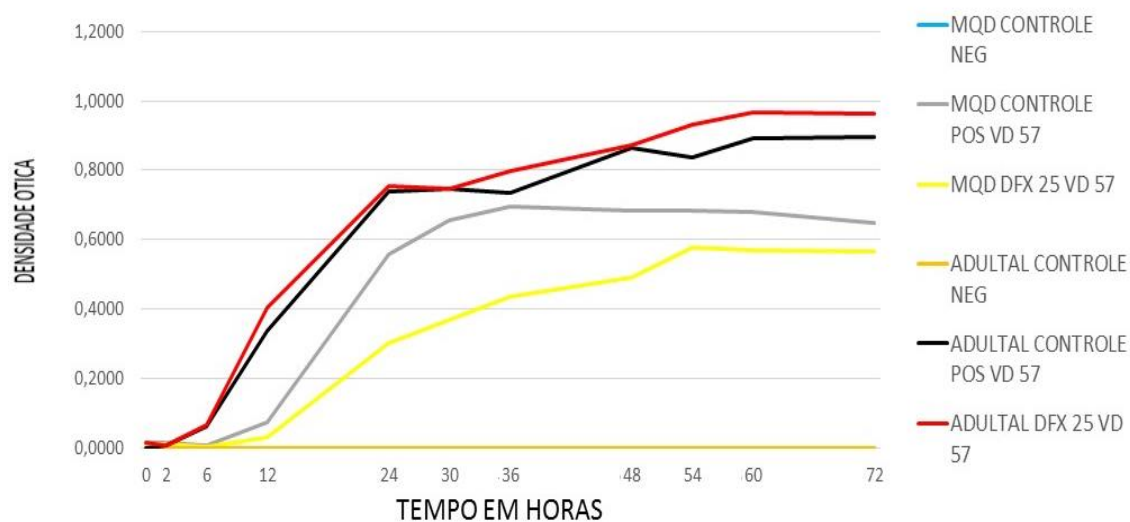
Possivelmente a cepa T1 não foi inoculada na quantidade adequada, sendo necessário repetir esta curva para confirmar o resultado, que esperamos que tenha o mesmo perfil de crescimento hda cepa VD57.

Buscando se aproximar do modelo animal, tem se usado o soro fetal bovino com o objetivo de mimetizar as condições de crescimento que a Cp teria no ovino e caprino. Assim realizamos os mesmos testes com o quelante (Figura 11), onde observamos um aumento da densidade ótica, que está diretamente relacionada ao aumento no número de microorganismos no meio de cultura (Sampaio, 2012).



**Figura 11:** Curva de crescimento testando SFB associado ao quelante, frente as duas cepas de Cp testadas, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.

A partir dos resultados encontrados com os cultivos em SFB, foi testado o quelante em um meio produzido no LABIMUNO (Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/UFBA), nomeado ADULTAL, onde material biológico de ovinos que não tinham sinais clínicos da doenças, bem como em testes sorológicos eram negativos para a linfadenite caseosa. Cultivamos em paralelo a cepa VD 57 no MQD (Figura 13). Ficou claro que a VD 57 cresceu mais no meio de cultura chamado de ADULTAL (grupos 84 à 104). Possivelmente em razão da sua riqueza em nutrientes, além disso a fase Lag foi muito mais curta que no MQD, a fase Log teve um pico de crescimento mais rápido e o ponto após 72 horas de cultivo que seria a fase estacionária, continuou crescendo, enquanto a do MQD já se encontrava em declínio.



**Figura 13:** Curva de crescimento testando meio de cultura ADULTAL, e o MQD como modelo comparativo frente a cepa VD57 de Cp, o CONTROLE NEG só possui o meio de cultura e o CONTROLE POS. o meio de cultura com a cepa bacterina.

Com estes resultados comprovamos a importância do quelante de ferro no ritmo de crescimento do Cp. O meio ADULTAL possivelmente também possua quelantes naturais por isso apresentou cinética de crescimento parecida como o mesmo meio associado ao quelante.

Demais resultados encontram-se na patente e artigo científico.

## 5. PATENTE

### “PROCESSO ESPECIFICO PARA EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS”

A presente invenção trata de resultado da identificação de moléculas com aplicação na área de Imunologia para produzir testes imunodiagnósticos e imunógenos para o *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Atualmente, a linfadenite caseosa (LC), enfermidade infecciosa causada pelo patógeno *Corynebacterium pseudotuberculosis*(Cp), é responsável por significativo grau de perdas econômicas na ovino-caprinocultura do Estado da Bahia. A doença apresenta um caráter crônico, sendo responsável por impactos negativos no ganho de peso e produção de leite, assim como pela desvalorização do couro e condenação de carcaças nos abatedouros de pequenos ruminantes. A sua erradicação é difícil, visto que está amplamente disseminada nos rebanhos mundiais (DORELLA *et al.*, 2006). Embora poucos monitoramentos epidemiológicos tenham sido realizados recentemente no Brasil, estes já indicam a alta disseminação da doença; um estudo realizado com os frigoríficos de Minas Gerais registrou uma frequência de infecção de ovinos de 43,7%, devendo ser ressaltado que 100% das fazendas que abateram animais no período do estudo apresentaram positividade (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Na Bahia, registrou-se uma soro prevalência de 55,3% em ovinos de uma fazenda comercial com um rebanho de 2500 animais (BASTOS *et al.*, 2011), assim como uma soro-prevalência de 22,1% em reprodutores ovinos amostrados em exposições agropecuárias (Nascimento, 2012). Considerando que o tratamento com antibióticos é inviável técnica e economicamente, a prevenção da entrada da doença em um rebanho através da imunização constitui a melhor opção de controle (MEYER *et al.*, 2002).

A patogênese da linfadenite caseosa está associada principalmente à estrutura peculiar da parede celular. A camada lipídica, presente na face externa da parede assemelha-se ao encontrado no gênero *Mycobacterium* (Hard, 1975). Essa camada impede a destruição do patógeno pelas enzimas lisossomais, permitindo com isso que *C. pseudotuberculosis* sobreviva dentro do macrófago como um agente intracelular facultativo (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; BRAITHWAITE *et al.*, 1993). Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* já foi evidenciada (BURRELL, 1979; MUCKLE&GYLE, 1983). A ampliação do



conhecimento sobre os diversos aspectos da relação entre o bacilo causador da linfadenite e o hospedeiro é fundamental para o estabelecimento de estratégias eficientes na contenção e eliminação deste agravo, visto que muitas lacunas ainda faltam ser preenchidas. Assim, o empenho para se conhecer como cepas virulentas e atenuadas de *C. pseudotuberculosis* se relacionam com o hospedeiro, gera informações úteis para o desenvolvimento de novas vacinas, *kits* de diagnóstico e terapia efetiva, além de gerar conhecimento sobre a cinética das respostas imunes contra bactérias intracelulares.

A LC ocorre em todas as áreas onde há significativa população de ovinos e caprinos no mundo, entretanto existem inúmeras dificuldades na obtenção de dados para se definir a prevalência desta doença, principalmente devido à sua característica essencialmente crônica e à sintomatologia não específica, escassa ou até mesmo ausente. Além disso, outros agentes etiológicos levam à formação de granulomas semelhantes, tais como *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*. Adicionalmente, na maioria dos inquéritos epidemiológicos, os dados baseiam-se em casos clínicos e animais provenientes de abatedouros, que não são remetidos para o abate quando apresentam a forma clínica da doença (UNANIAN *et al.*, 1985).

Embora haja uma crescente demanda de resoluções para a LC, pouco se investigou sobre os mecanismos moleculares da virulência em *Cp*. Nos últimos 20 anos, dois determinantes da virulência foram bem caracterizados: a exotoxina fosfolipase D (PLD) e os lipídeos tóxicos da parede celular, também denominados de ácidos corinomicólicos. A PLD é considerada como o principal fator de virulência desta bactéria (LIPSKY *et al.*, 1982; HODGSON *et al.*, 1999), constituindo um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina da membrana de células de mamíferos (CARNE E ONON, 1978; COYLE E LIPSKY, 1990; MCNAMARA *et al.*, 1995). Dessa forma, esta exotoxina contribui para a dispersão do micro-organismo do sítio inicial de infecção para sítios secundários dentro do hospedeiro (HODGSON *et al.*, 1992; WILLIAMSON, 2001). Por outro lado, os ácidos corinomicólicos são lipídeos de superfície de *Cp* que contribuem para a patogênese da doença (HARD, 1972), de forma que linhagens mais virulentas possuem mais lipídeos que as linhagens atenuadas (Jolly, 1966). Jolly (1966) atribui à presença destes lipídios a formação de flocos característicos em meio líquido. Os lipídios contribuem também para a resistência contra agentes antimicrobianos e resistência a agentes ácidos ou alcalinos, tanto no ambiente intracelular, como extracelular (DHEDA

*et. al.*, 2010). Esta camada lipídica representa uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos de macrófagos. Além de permitir a aderência dos micro-organismos, promove uma citotoxicidade local (MUCKLE & GYLES, 1982; ALVES *et al.*, 1997).

Segundo Willianson (2001), os lipídios celulares atuam como fator piogênico e estes são fatores de virulência e estão associados com a formação de granulomas (JOLLY, 1966). Em trabalhos experimentais, tanto em camundongos quanto em ovinos, houve alta relação entre conteúdo lipídico das linhagens testadas e capacidade de formar granulomas (BURRELL, 1978; MUCKLE & GYLE, 1983).

Lipídios associados a açúcares se tornam um fator de virulência que vem sendo estudado e relacionado com a imunopatogenicidade de *C. pseudotuberculosis*; estes são: âncoras de fosfatil-mio-inositol associado à manose (PIMs), lipomanano (LM) e lipoarabinomanano (LAM). Esses são os mais abundantes glicocolipídios de importância médica e médica veterinária (MISHRA *et al.*, 2008).

Após o completo sequenciamento do genoma de Cp, estudos *in silico* demonstraram a associação de alguns genes com possíveis mecanismos de virulência do micro-organismo; os genes já caracterizados encontram-se dispostos na tabela 1 (D'AFONSECA *et al.*, 2008), os quais estão atualmente depositados no GenPept (National Center for Biotechnology Information – NCBI). Dentre estes genes, foram registrados quatro genes (*fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*) que compõem o *operon fag ABC*, o qual é responsável pela expressão de proteínas envolvidas na captação de ferro (transportador ABC) que contribuem para a persistência bacteriana em modelo de infecção caprina. Estes genes são regulados pela disponibilidade de ferro do ambiente, sendo mais expressos em condições de restrição de elemento químico (BILLINGTON *et al.*, 2002). Este sofisticado mecanismo foi amplamente descrito em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo possível encontrar diversos trabalhos publicados sobre as bases moleculares da captação de ferro, e as moléculas envolvidas são comumente denominadas de sideróforos (HEINRICHS *et al.*, 1999; BROWN *et al.*, 2001a,b).

**Tabela 1.** Genes de *Corynebacterium pseudotuberculosis* depositados no GenPept, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (D'AFONSECA *et al.*, 2008).

Accession number (GenPept)	Putative protein	Reference
ABI29892	10-kDa chaperonin GroES	Coelho KS and Azevedo V (unpublished results)
AAV48830	60-kDa chaperonin 1	Estevam E, Miyoshi A and Azevedo V (unpublished results)
ABI75067	65-kDa heat shock protein	Flandrois J-P and Fardel G (unpublished results)
AAB71614	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons et al., 1997
AAB71615	AroB (3-dehydroquinase)	Simmons et al., 1997
P96749	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons et al., 1997
P96750	AroQ (3-dehydroquinase dehydratase)	Simmons et al., 1997
AAL79811	FagA (integral membrane protein)	Billington et al., 2002
AAL79810	FagB (iron-enterobactin transporter)	Billington et al., 2002
AAL79809	FagC (ATP-binding cytoplasmic membrane protein)	Billington et al., 2002
AAL79812	FagD (iron-siderophore binding protein)	Billington et al., 2002
P20626	Phospholipase D precursor	Hodgson et al., 1990
AAA64910	Phospholipase D	Cuevas and Songer, 1993
AAA99867	Phospholipase D	McNamara et al., 1994
CAA01541	Phospholipase D	-
AAA82608	Protein recA	Pogson et al., 1996
P48288	Protein recA	Pogson et al., 1996
AA589201	RpoB (RNA polymerase $\beta$ subunit)	Khamis et al., 2004
AAA67924	Serine proteinase precursor	Wilson et al., 1995

No que se refere ao ferro como nutriente para micro-organismos, diversas pesquisas já demonstraram que este metal é uma molécula fundamental para o metabolismo e crescimento bacteriano, participando de processos celulares envolvidos, por exemplo, no estresse oxidativo, de modo que a sua aquisição por um micro-organismo constitui um dos fatores de maior importância para a sua sobrevivência no ambiente durante a infecção do hospedeiro (BROWN AND HOLDEN, 2002). Por outro lado, humanos e animais desenvolveram mecanismos de defesa naturais associados à retenção do ferro corporal, os quais são desenvolvidos por proteínas como a transferrina, ferritina e lactoferrina. O sequestro do ferro por estas moléculas o indisponibiliza para captação por micro-organismos, o que contribui para a redução da proliferação bacteriana após o início da infecção (BULLEN *et al.*, 2005). Muitos micro-organismos dependem do equilíbrio entre capturar ferro para crescer, sobreviver e evitar os seus efeitos tóxicos (CROSA, 1997; HANTKE, 2001).

Partindo do princípio que o ambiente de infecção do hospedeiro apresenta naturalmente uma baixa disponibilidade de ferro, regulado possivelmente por genes de *Cp* como: *ciu* e *opp*, pesquisadores passaram a buscar uma mimetização dessas condições em modelos *in vitro*, de forma que os micro-organismos expressassem os possíveis fatores de virulência que são realmente expressos *in vivo*. A restrição do ferro para micro-organismos em meios de cultura foi alcançada pela suplementação com agentes quelantes, como mesilato de desferroxamina, deferiprona e deferasirox

(Maureret *et al.*, 2007; Paradkaret *et al.*, 2008); outros estudos buscaram tal mimetismo realizando o cultivo bacteriano diretamente em soro humano e animal ou em soro fetal bovino industrial, os quais são ambientes naturalmente ricos em proteínas quelantes de ferro (OOGAI *et al.*, 2011).

Dentre os avanços científicos gerados nessa área, pesquisas recentes já registraram a existência de genes e fatores de virulência regulados pela disponibilidade de ferro, de forma que o perfil de expressão gênica e o proteoma bacteriano são alterados como resposta à restrição férrica. A partir de modificações nos meios de cultura, novos fatores de virulência associados ao metabolismo do ferro, patogênese bacteriana e persistência do patógeno no hospedeiro foram descobertos em *Corynebacterium diphtheriae* (Schmitt, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (CRONJÉ *et al.*, 2005; RODRIGUEZ & SMITH, 2006), *Mycobacterium avium* (JANAGAMA *et al.*, 2010), *Rhodococcus equi* (BOLAND & MEIJER, 2000; BARGEN *et al.*, 2011), *Francisella tularensis* (LENCO *et al.*, 2006) e *Chlamydophila pneumoniae* (MAURER *et al.*, 2007), dentre outros micro-organismos intracelulares.

Considerando a demanda mundial para o controle da Linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos e a escassez de conhecimento sobre os fatores de virulência de *Cp*, faz-se necessária a realização de estudos voltados para compreensão dos mecanismos de patogênese do micro-organismo e suas moléculas associadas. Nesse sentido, ensaios *in vitro* de crescimento de *Cp* sob condições de restrição de ferro podem contribuir para a expressão de um novo perfil proteico, de forma que moléculas fundamentais à patogênese e ainda desconhecidas possam ser identificadas e caracterizadas e, posteriormente, utilizadas na elaboração de novos modelos vacinais.

Parte da invenção aqui descrita, refere-se à extração de antígenos de *Cp*. Detectou-se características de crescimento diferentes quando cultivados em meios de cultura com condições de abundância e restrição de ferro, e a partir daí extraiu-se os antígenos pelo processo de extração e separação das moléculas extraídas requerido nesta patente.

Utilizou-se a linhagem bacteriana: VD57 da Coleção de Micro-organismos do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, mantida em glicerol, a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Esta linhagem foi isolada a partir de material caseoso de um caprino com linfadenite caseosa no município de Juazeiro, Estado da Bahia. A confirmação da identificação foi feita através de coloração de Gram, morfologia colonial, hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi*,

produção de urease e catalase e posteriormente confirmada através de *kit* API Coryne (BioMérieux) (MOURA-COSTA *et al.*, 2008).

As condições de cultivo foram estabelecidas em conformidade com o descrito por OOGAI *et al.* (2011), com pequenas modificações. A bactéria foi ativada, com o objetivo de ter suas características de crescimento reestabelecidas em 5 mL de caldo BHI (*Brain heart infusion*), através de repiques (diluição 1:10) a cada 48h até apresentarem crescimento satisfatório. Após ativação, a cultura bacteriana foi expandida para um volume de 50 mL, também com diluição 1:10; após 48h, o material foi centrifugado por 15 minutos a 3000g, e o sedimento bacteriano foi ressuspense em PBS estéril, dividido igualmente e adicionado em 250 ml do BHI. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação (180 rpm) em agitador orbital automático (*shaker*) por 30 horas.

O crescimento de *C. pseudotuberculosis* foi monitorado através de espectrofotometria; alíquotas de 0,3 mL foram retiradas das culturas a cada hora para verificação da absorbância em leitora de microplacas, em comprimento de onda de 600 nm (adaptado de Pacheco *et al.*, 2012). No momento em que a absorbância alcançou o valor de  $0,700 \pm 0,030$ , correspondendo à metade da fase logarítmica de crescimento do micro-organismo, foi retirada uma alíquota de 80 mL de cada cultivo para obtenção da massa bacteriana; ao final das 32 horas de incubação, retirou-se a outra alíquota de 80 mL para obtenção da massa bacteriana correspondente ao momento intermediário da fase estacionária do crescimento. A cultura foi centrifugada por 40 minutos a 4000g a 4°C para retirada do sobrenadante. Os sedimentos bacterianos foram lavados por 3 vezes em PBS Tween 0,05%, para a realização das etapas seguintes.

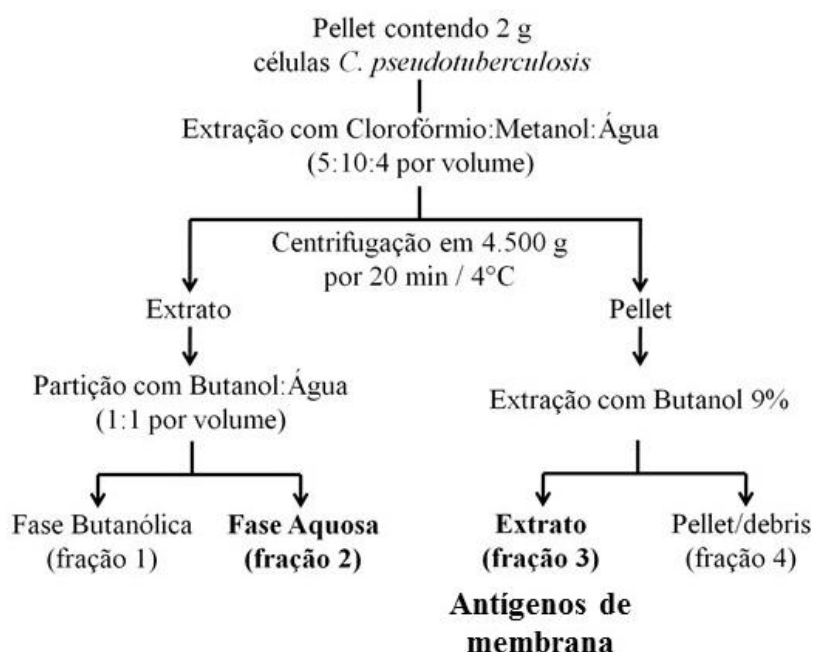
A massa bacteriana foi ajustada para o peso de 2 g e ressuspensa em 10 mL de solução composta por clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) e sonicadas a 60 Hz (cinco ciclos de 60 s). O material foi submetido à extração três vezes com 35 ml de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) por quatro horas sob agitação, seguida de centrifugação a 4.500 g por 20 min a 4°C. O sedimento obtido após esta extração foi secado sob gás N<sub>2</sub>(nitrogênio) e extraído três vezes com 35 ml de 9% butanol em água por 3 h sob agitação, seguido de centrifugação a 4.500 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a rota-evaporação até se alcançar o volume de 8 mL, sendo esta fração denominada de antígenos de membrana. A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando soro albumina bovina como padrão.

A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada, em consonância com as figuras em anexo, onde:

O presente invento resultou na purificação, de glicoproteínas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

A Figura 1 representa o fluxograma da estratégia utilizada para o fracionamento dos componentes estruturais de *C. pseudotuberculosis* com base em suas características de hidrofobicidade.

Para que o processo possa ser mais bem compreendido e avaliado, sua descrição detalhada será feita a seguir. A invenção consiste na extração e purificação, pela primeira vez, de uma fração e posterior subfração de superfície extraída com solventes orgânicos.



**Figura 1.** Fluxograma da estratégia utilizada para o fracionamento dos componentes estruturais de *C. pseudotuberculosis* com base em suas características de hidrofobicidade.

O antígeno de membrana passou por um processo de subfracionamento, realizado com cromatografia por interação hidrofóbica, utilizando diferentes gradientes de propanol.

Até então não foi extraído nem utilizada a extração de sub-frações de antígenos de superfície de *Cp* com solventes orgânicos, na literatura mundial.

O perfil eletroforético do antígeno de membrana está representado na Figura 2.

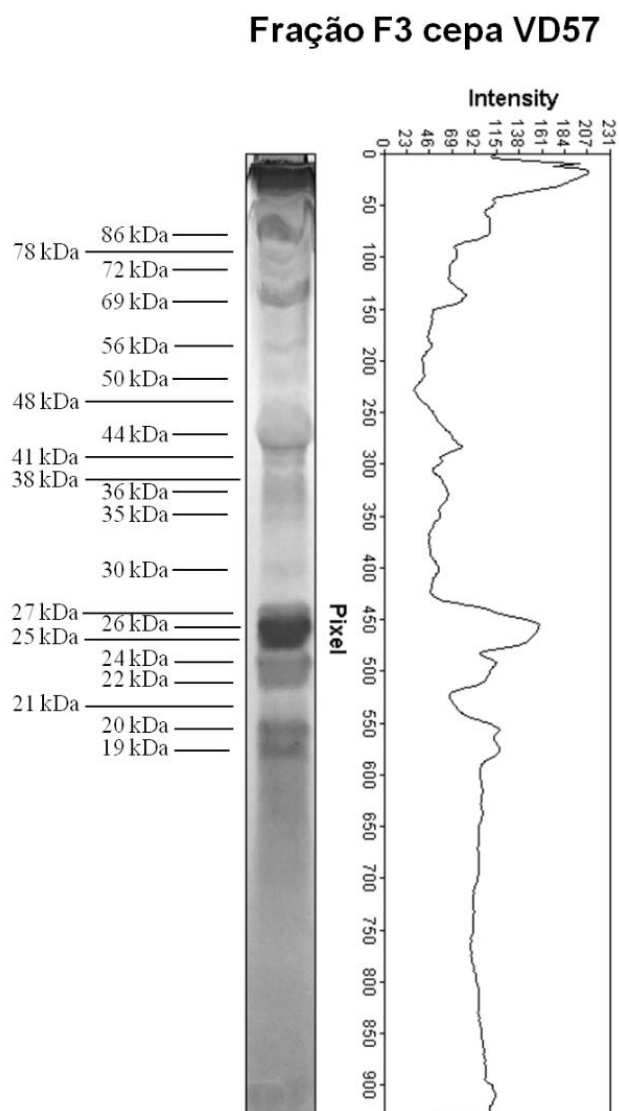


FIGURA 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% da fração dos antígenos de membrana de moléculas estruturais hidrofóbicas de *C. pseudotuberculosis* da cepa VD57 corado pelo nitrato de prata.

A análise por *Western Blot* realizada com *pool* de soros ovinos positivos para IgG anti-*C. pseudotuberculosis*, apresentada na Figura 3, revelou que antígenos com pesos moleculares estimados de 59 kDa, 50 kDa, 48 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 21 kDa, 20 kDa e 19 kDa foram reconhecidas na fração dos antígenos de membrana, algumas destes pesos moleculares estão relacionados a proteínas a exemplo da PLD na Tabela 1.

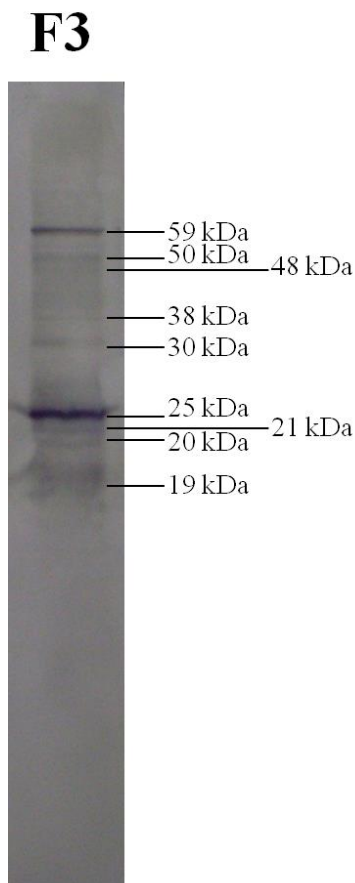


Figura 3. PERFIL DE RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO POR IGG DE ANTÍGENOS ESTRUTURAIS DA FRAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE MEMBRANA EXTRAÍDOS DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* DA CEPA VD57. AS MEMBRANAS FORAM INCUBADAS COM POOLS DE SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LINFADENITECASEOSA; AS AMOSTRAS INCUBADAS COM O POOL NEGATIVO NÃO FORAM INCLUÍDAS NA FIGURA POR NÃO APRESENTAREM RECONHECIMENTO ANTIGÊNICO ALGUM.

Antígenos usados até então em testes diagnósticos, são secretados produzidos em meios de cultura ricos em nutrientes. Já se sabe que estes possuem grande quantidade de proteínas do meio onde são cultivados.

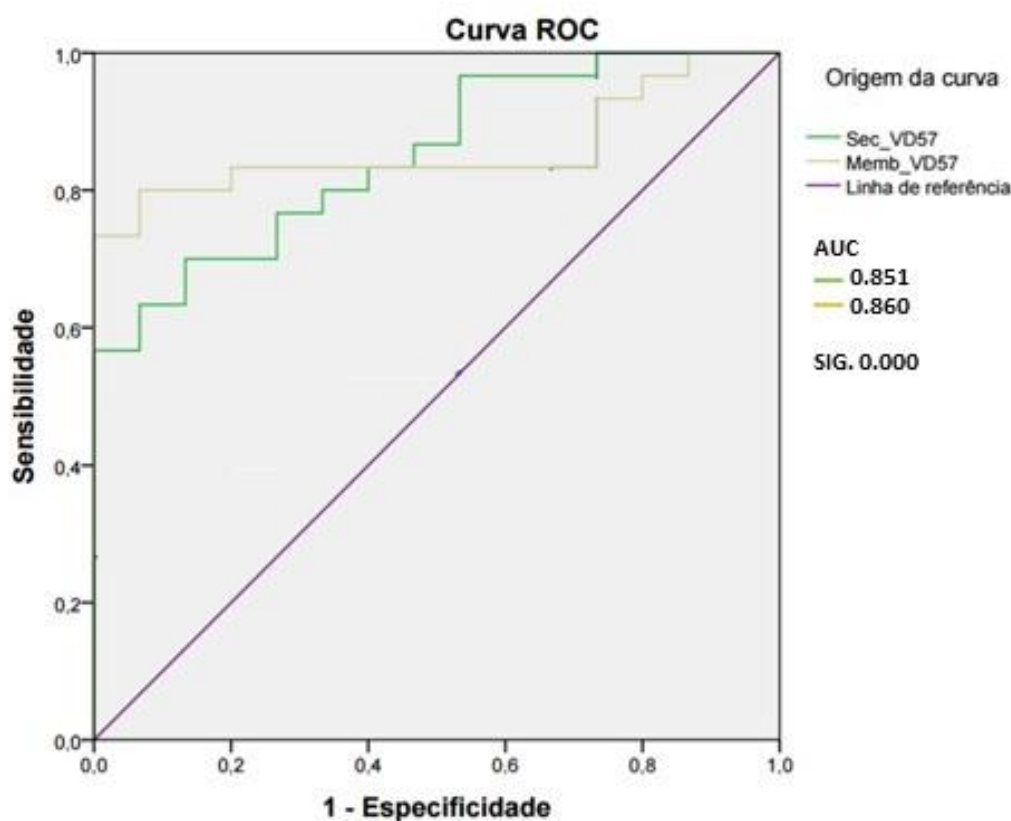
Com o intuito de solucionar tais problemas, desenvolveu-se a presente invenção, tendo em vista que a fração dos antígenos de membrana só contem antígenos do microorganismo, e pode ser utilizado como teste imunodiagnóstico. O teste desenvolvido é um ensaio imunoenzimático (ELISA Indireto), utilizando o antígeno extraído de *Cp* para diagnóstico da LC. A principal inovação deste teste diagnóstico é a maior confiabilidade, pois utiliza antígenos que são extraídos do microorganismos diferente do teste ELISA indireto desenvolvido e utilizado atualmente no Laboratório de Imunologia do ICS - UFBA, com antígeno secretado da cepa T1 em meio de cultura BHI. A curva Roc dos dois testes (Figura 4) com antígeno secretado de VD57 (Sec\_VD57) e de membrana de VD57 (Memb\_VD57), demonstraram os seguintes resultados:



\*Sec\_VD57, obteve uma área sob a curva de 0,851, com significância de 0,000. A sua especificidade ficou em 70% e sensibilidade em 86,7%.

\*Memb\_VD57 que o antígeno de membrana, obteve uma área sob a curva de 0,860, com significância de 0,000. A sua especificidade 80% e sensibilidade em 97,3%.

Assim confirmamos que os resultados do Elisa com o antígenos de membrana, são mais confiáveis que os outros dois testes.



**Figura 4** – CURVA ROC COM OS RESULTADOS DOS DOIS TESTES ELISA, AUC (ÁREA SOB A CURVA) E SIG (SIGNIFICÂNCIA ASSINTÓTICO).

Foram utilizados 45 soros de ovinos para a padronização do teste, 15 destes SOROS eram negativos no ELISA indireto realizado pelo LABIMUNO, e 30 destes soros em ade animais haviam sido desafiados com a vepa virulenta VD 57 há 42 dias onde alguns já apresentavam granulomas, o soro controle negativo é de um animal que ainda não havia mamado e o positivo de um animal com granulomas, as respectivas densidades óticas foram 0,087 e 0,595 com o antígeno Sec\_VD57, 0,022 e 1,204 com o antígeno Memb\_VD57. Na leitura da densidade ótica, as placas foram lidas com filtro duplo 450nm e 620nm, os antígenos foram todos produzidos em meio BHI utilizando a cepa VD57.

O protocolo de padronização do ELISA indireto dos antígenos Sec\_VD57 e

Memb\_VD57, está na Figura 5. Primeiro foi padronizadamos a concentração de antígeno usado em cada poço em relação a diluição do soro, em seguida, a diluição do conjugado e o tempo decorrido até a leitura no densitômetro ótico (tempo de revelação).

	Ag	0,5ug			1ug			2ug			4ug		
SORO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1;50	A												
	B	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
	C												
1;100	D	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
	E												
	F	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
1;200	G												
	H	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP

	conjugado	1;40000			1;20000			1;10000			1;5000		
SORO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1;50	A												
	B	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
	C												
1;100	D	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
	E												
	F	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
1;200	G												
	H	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP

	tempo rev	5min			10min			15min			20min		
SORO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1;50	A												
	B	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
	C												
1;100	D	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
	E												
	F	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP
1;200	G												
	H	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP	B	CN	CP

**Figura 5.** Esquema de padronização do ELISA indireto dos antígenos Sec\_VD57 e Memb\_VD57. B – branco, CN – controle negativo e CP – controle positivo.

### Protocolo

A placa de ELISA de alta adesão foi sensibilizada com 1 µg/ poço, diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,5M, pH9,6. A placa foi incubada a 4°C durante 12-16 horas em câmara úmida. Após este período, os poços da placa foram lavados 2 vezes com 200µL de PBS-Tween 20 (0,5%), em seguida bloqueados com 200µL de uma solução de PBS-T com Molico 5% e a placa incubada por 2 horas em câmara úmida a 37°C.

Os soros testados foram diluídos em PBS-T com Molico 1%:

\*Sec\_VD57 – 1:100.

\*Menb\_VD57 – 1:200.

Os poços da placa foram lavados 1 vez com 200µL de PBS-Tween 20 (0,5%), em seguida foram colocados 50µL da diluição de cada soro em duplicata nos poços e a placa colocada na estufa por 1 hora a 37°C. Passado este tempo os poços da placa foram

lavados 5 vezes com 200µL de PBS-Tween 20 (0,5%), em seguida 50µL do conjugado com IgG anti-ovino diluído 1:20000 foram colocados em cada poço de placa e incubado por mais 45 minutos a 37°C.

Novamente os poços da placa foram lavados 2 vezes com 200µL de PBS-Tween 20 (0,5%) e logo após 50µL de TMB (tetrametilbenzidina) foram colocados em cada poço. Após 15 minutos a reação foi parada com 25µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N). A placa foi lida com filtro duplo de 450-620nm de comprimento de luz.

Os pontos de corte da placas sensibilizadas foram:

\*Sec\_VD57 – 0,238.

\*Memb\_57 – 0,354.

## REIVINDICAÇÕES

1. “SISTEMA DE EXTRAÇÃO DE ANTÍGENOS (COMPOSTO PRINCIPALMENTE POR GLICOPROTEÍNAS ANTIGÊNICAS” constituído por um processo de quebra de micro-organismos e extração de seus componentes antigênicos com o uso de solventes orgânicos e processo de subfracionamento, como esquematizado no fluxograma da Figura 1; tais antígenos apresentam características lipo e glicoproteicas.
2. “ELISA INDIRETO PARA *Corynebacterium pseudotuberculosis* UTILIZANDO os antígenos de membrana COMO ANTIGENO” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar especificidade de 80% e sensibilidade de 97,3%, sendo estes resultados compatíveis com os do ELISA padronizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO/UFBA) que possui hoje especificidade de 100% e sensibilidade de 93,5. Os antígenos utilizados nesta comparação foram extraídos do mesmo meio de cultura.
3. “Antígeno de membrana extraído de *Corynebacterium pseudotuberculosis*” segundo a reivindicação 1.

## RESUMO

**“PROCESSO ESPECIFICO PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO COM ANTÍGENOS DE MENBRANA, UTILIZADO NA EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO PARA *Corynebacterium pseudotuberculosis*”**

A presente invenção diz respeito ao processo para obtenção de moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* subfracionadas cultivadas em BHI, demonstrando que os meios sintéticos utilizados possivelmente não induzem a expressão de proteínas que a bactéria utiliza quando infectando o hospedeiro. Tais antígenos também foram utilizados em um teste imunoenzimático indireto que detecta anticorpos IgG, presentes nos soros de indivíduos ou animais portadores da Linfadenite caseosa, portadores ou não do micro-organismo.

## 6. ARTIGO CIENTÍFICO 1

### Submetido a BMC Microbiology

#### Identification of membrane associated proteins expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum

José Tadeu Raynal, Roberto Meyer

#### Abstract

**Background:** *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the causative agent of sheep and goat caseous lymphadenitis, which is responsible for economic losses in farms and slaughterhouses worldwide. Biotechnological approaches have been used to define secreted proteins that might be used as vaccine targets; however, such exoproteome might not reflect the repertoire of proteins expressed during infection conditions, since all works used chemically defined culture media. Thus, this study aimed to investigate the membrane associated proteins expressed by *C. pseudotuberculosis* grown directly in animal serum, as well as to identify *in silico* the proteins with pathogenic potential that can be used as vaccine targets.

**Results:** *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 strain has been directly cultivated in bovine fetal serum and its membrane associated proteins have been extracted using an organic solvent enrichment methodology, following a LC-MS/MS analysis for protein identification. One hundred and sixteen proteins were identified by this methodology and bioinformatics analysis revealed that 35 sequences were classified as membrane, cell wall or extracellular proteins, and presented at least one transmembrane-helix or a signal peptide. Twenty-two proteins were *in silico* characterized as potentially pathogenic, being 11 of them uncharacterized proteins yet. The protein-protein interaction analysis indicated that the four potentially pathogenic proteins *ciuA*, *fagA*, *OppA4* and *OppCD* were biologically connected within two distinct network pathways, which were both associated with ABC Transporters KEGG pathway.

**Conclusion:** The membrane associated proteins herein reported potentially reflects part of the protein repertoire expressed during real infection conditions. According to bioinformatics predictions, the transport and uptake of nutrients was the major bacterial functional feature associated with *C. pseudotuberculosis* pathogenesis, and the proteins

integrating the operons *ciuABCDE*, *fagABCD* and *oppBCDA* are suggested to be strategic proteins that should be tested as targets in next vaccine models.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, antigens and virulence factors.

## Background

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the causative agent of sheep and goats caseous lymphadenitis, which is an infectious disease responsible for high level of economic losses in livestock sector. It is a chronic disease accounting for negative impact on weight gain and milk production, as well as the devaluation of the leather and condemnation of carcasses in small ruminant slaughterhouses [1]. During the years between 1972 and 2011, at least 39 vaccine models against *C. pseudotuberculosis* were suggested by researchers around the world; these immunogens involved the use of bacterins and formalin-neutralized toxoids, genetically modified bacteria, recombinant antigens, and attenuated strains of the microorganism. However, no product presented satisfactory effectiveness, offering complete protection to the animals in a herd [2].

Biotechnological approaches have been used by researchers to characterize the bacterial exoproteome and discover novel secreted antigens that can be used as vaccine candidates against *C. pseudotuberculosis* infection. Particularly, the use of high-throughput proteomic approaches allowed the identification of more than 100 extracellular proteins [3,4,5], which were further submitted to a serological proteome analysis (SERPA), involving the immunoblotting of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and identification of antigenic spots by mass spectrometry [6,7]. Another proteomic approach involved the *in vitro* simulation of the nitrosative stress that *C. pseudotuberculosis* is subjected inside macrophages during the infection process; analysis of the exoproteome of bacteria grown in the presence of nitric oxide revealed the expression of 102 proteins exclusive of such phenotype [8].

Those exoproteomic studies largely contributed to the identification of *C. pseudotuberculosis* secreted proteins that might be used as vaccine targets; however, those results might not reflect the repertoire of proteins expressed during infection conditions, since all works used synthetic and chemically defined culture media.

According to previous works, growing bacteria directly in serum as culture medium significantly increases the expression of virulence factors [9]. Another important aspect is that such studies did not focus on somatic antigens that are associated with cytoplasmic membrane; these proteins might be involved in interactions with infected hosts, such as adherence and internalization, as well as mediate the transport of nutrients, waste products, secreted virulence factors, and other compounds, which are important for bacterial growth and infection [10]. Besides, membrane proteins exposed on the bacterial surface can be promptly recognized by the host's immune system, constituting good candidates of protective antigens to be applied in novel vaccine models [11]. Considering the above information, this study aimed to identify membrane associated proteins expressed by *C. pseudotuberculosis* grown directly in animal serum, as well as to identify *in silico* the proteins with pathogenic potential that can be used as vaccine targets.

## Results and discussion

*Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 strain has been directly cultivated in bovine fetal serum and its membrane associated proteins have been extracted using an organic solvent enrichment methodology, following a LC-MS/MS analysis for protein identification. One hundred and sixteen proteins were identified by this methodology and were *in silico* characterized according to their subcellular localization and topology (Additional file 2). The list of identified membrane associated proteins is presented in Table 1. The bioinformatics analysis revealed that 35 sequences were classified as membrane, cell wall or extracellular proteins, and presented at least one transmembrane-helix or a signal peptide. This result indicates that the chosen organic solvent enrichment methodology was effective in extracting membrane associated proteins.

The *in silico* prediction of potentially pathogenic proteins revealed that 22 of the identified membrane associated proteins are associated with *C. pseudotuberculosis* pathogenesis, being 11 of them uncharacterized proteins yet (Table 1). Literature review indicates that few studies have investigated the virulence determinants of *C. pseudotuberculosis*, if compared to other pathogenic bacteria; most traditional studies have focused on the secreted antigens such as the exotoxin phospholipase D (PLD) and the corynebacterial protease 40 (CP40) [2].

The protein-protein interaction analysis and functional enrichment performed using STRING indicated that the four potentially pathogenic proteins *ciuA* (*ciuA* CpC231\_0982), *fagA* (*fagA* CpC231\_0028), *OppA4* (*oppA4* CpC231\_1167) and *OppCD* (*oppCD2* CpC231\_2060) were biologically connected within two distinct network pathways, which were both associated with ABC Transporters KEGG pathway (Figure 1). Traditionally, bacterial ABC transporters have been considered to play roles in nutrient uptake and drug resistance. However, there is increasing evidence that these transport systems play either direct or indirect roles in the virulence of bacteria [12].

The CiuA protein, identified in the present work, has been recently characterized to participate in the core *C. pseudotuberculosis* pan-exoproteome, being located in the operon *ciuABCDE* (ABC-type transporter and siderophore biosynthesis-related proteins) in the pathogenicity island 4 (PiCp4) [4, 13, 14]. An iron-acquisition-deficient mutant strain (CZ171053) of *C. pseudotuberculosis* was used in mice vaccination trials and proved that siderophores in such intracellular bacteria are extremely important virulence factors that allow host infection, possibly helping the pathogen to strip iron from chelators such as transferrin, lactoferrin and hemoglobin-haptoglobin complexes. The mutant bacteria had the *ciuA* gene disrupted and the respective encoded protein responsible for the transport of iron from ferric citrate was not expressed. The experiment revealed that the CZ171053 had reduced intracellular viability and 80% of the animals that were immunized with such mutant strain survived after the challenge with a virulent strain [15].

The identification of FagA (*fagA* CpC231\_0028) in the present study might indicate a possible complementation of functions between the two operons *ciuABCDE* and *FagABCD* for the uptake of iron by the *C. pseudotuberculosis*. This is in accordance with the experimental evidence reported in a previous research using a recombinant *C. pseudotuberculosis* strain carrying a *fagA-lacZ* fusion indicated that the putative *fagABC* operon was poorly expressed in iron-rich media, when performing beta-Galactosidase assays. However, similar experiments in iron-limited media resulted in an approximately three-fold increase in beta-galactosidase activity, suggesting that this operon was regulated by iron in vitro. Another *fagB(C)* mutant showed reduced virulence compared to wild-type in a goat model of caseous lymphadenitis, indicating that the expression of the *fag* genes in the host also appears to contribute to virulence [16].



Concerning the oppA4 and oppCD2 proteins (Uniprot Entries D9QAR7 and D9QDC4, respectively) identified in the present study, the previous pan-genomics analysis demonstrated that opp (oligopeptide permease) genes also participate in the core *C. pseudotuberculosis* pan-exoproteome [4]. These opp transporters are located in the plasma membrane and have functions generally related to cell nutrition and the uptake of peptides from the extracellular environment. An experiment using an OppD-deficient *C. pseudotuberculosis* strain demonstrated that such mutant presented a reduced ability to adhere to and infect macrophages compared to the wild-type bacteria, although both strains exhibit the same potential to colonize spleens and cause injury and death to infected mice [17]. Transcriptomics experiments have demonstrated that *C. pseudotuberculosis in vitro* replication is decreased when it is grown under stressful conditions (acid, osmotic and thermal shock stresses), possibly due to the repression of oppA and oppB6 genes, which encode proteins related to the maintenance and replication of the organism in the environment [18]. However, the identification of oppCD and oppA4 in the present study might indicate the expression of these proteins potentiated the bacterial survival and replication when exposed to constituents of animal serum, and could play an important role when *C. pseudotuberculosis* is infecting goats and sheep.

Concerning the other potentially pathogenic proteins identified in the present study (Table 1), most of them did not have the function experimentally studied in *C. pseudotuberculosis*, but functional information from the respective heterologous proteins in other bacterial species revealed that some of them might also contribute for host-pathogen interactions and microbial virulence, as discussed below.

The Mycosubtilin synthase subunit B (mycB CpC231\_1794) integrates the gene cluster responsible for the biosynthesis of mycosubtilin, but it is considered a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase and a fatty acid synthase, according to experimental works involving *Bacillus subtilis* ATCC6633. The putative operon spans 38 kb and consists of four ORFs, designated fenF, mycA, mycB, and mycC, with strong homologies to the family of peptide synthetases. Biochemical characterization showed that MycB specifically adenylates tyrosine, as expected for mycosubtilin synthetase, and insertional mutagenesis of the operon resulted in a mycosubtilin-negative phenotype [19]. Mycosubtilin is a natural antimicrobial lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* strains, and it was demonstrated

that it presents *in vitro* hemolytic activity [20], possibly due to a direct interaction with the plasma membranes of sensitive cells [21].

Concerning the ESX-3 secretion system protein (eccC3 CpC231\_0404), information from *Mycobacterium tuberculosis* species indicates that it is a type VII secretion system which is essential for bacterial viability and is involved in iron uptake and in the adaptation to low zinc environments. It has been proposed that such secretion system is essential for iron and zinc homeostasis not only in conditions in which the concentrations of these metals are limiting but also in metal sufficient conditions [22]. One plausible hypothesis is that mycosubtilin-mediated hemolysis and iron uptake by ESX-3 secretion system protein could improve the function of other iron acquisition genes such as *ciuA*, *fagA*, *OppA4* and *oppCD2*, identified in the present study. Considering that transport and uptake of various nutrients by ABC transporters directly influence the virulence of pathogenic bacteria [12], the identification of ABC transporter inner membrane protein (CpC231\_1467), which belongs to the ABC-4 integral membrane protein family and presents a permease protein domain, can complement the suggested hypothesis that some sequenced proteins are co-working to improve growth of *C. pseudotuberculosis* in serum.

The transmembrane transport protein MmpL (mmpL CpC231\_1939) integrates a family of proteins that translocates complex glycolipids and siderophores across the cell envelope of mycobacteria and closely related Corynebacteriaceae and plays important roles in the biogenesis of the outer membrane of these organisms [23]. Particularly, MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria, which are vital components of the cell wall of the tubercle bacillus *Mycobacterium tuberculosis* and are required for intracellular survival in macrophages and drug resistance [24], as well as for bacterial viability and virulence [25]. Review of literature has also demonstrated that cell wall formation and glycolipids are associated with virulence and resistance of *C. pseudotuberculosis* [2].

Regarding the lpqU family protein (lpqU CpC231\_0712), its specific association with bacterial pathogenesis still remains unclear, but experimental evidence indicate that it might play a role in bacterial viability and resistance. During *in vitro* experiments involving the activity test of chemotherapeutic drugs against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates, the transcriptional profile of lpqU gene was significantly upregulated [26]. However, other research work dealing with *M. tuberculosis* sensitivity to a vitamin C-induced Fenton reaction demonstrated that a transcriptional profile with

significant downregulation of *lpqU* gene [27]. Regarding the host-pathogen effect, a recent work using recombinant *M. paratuberculosis* *lpqU* protein to stimulate bovine macrophages demonstrated that it did not influence the transcription profile of the macrophage cytokines *in vitro* [28]; however, it was reported to be a seroreactive protein after probing with sera from *M. bovis*-infected cattle [29].

According to Uniprot annotation, Surface antigen (CpC231\_0173) presents an adhesion domain, which is found in adhesin proteins, forming part of the adhesive pilus found on the cell surface. In general, bacterial adhesins have been recognized as key factors that influence host-pathogen interactions and microbial virulence [30].

Concerning the Copper resistance D domain-containing protein (copD CpC231\_1627), it integrates a cluster of copper tolerance genes that present the main function of protect bacteria from copper intoxication, which is a component of host nutritional immunity; studies suggest that the toxic properties of copper are harnessed by the innate immune system of the host to kill bacteria [31].

## Conclusions

In conclusion, considering that growing *C. pseudotuberculosis* directly in animal serum provides the bacterial exposition to real host constituents, the membrane proteins herein reported potentially reflects part of the protein repertoire expressed during real infection conditions. Based on the predicted pathogenic membrane proteins and protein-protein interaction network, the transport and uptake of nutrients was the major bacterial functional feature associated with *C. pseudotuberculosis* pathogenesis, followed by actions associated with cell envelope formation, resistance and adhesion. Finally, the proteins integrating the operons *ciuABCDE*, *fagABCD* and *oppBCDA* are suggested to be strategic proteins that should be tested as targets vaccine models against sheep and goat caseous lymphadenitis.

## Methods

### Bacterial strain and growth conditions

The strain VD57 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* was used in this study, which came from the Bacterial Collection of the Institute of Health Sciences of the Federal University of Bahia (UFBA), Brazil. The strain was isolated from a goat caseous granulomas found in Bahia state, and microbiological identification was confirmed by biochemical tests (API CORYNE, Bio-Merieux SA, France); VD57 has been used in

previous research works of such University as the virulent reference strain [32, 33]. The bacteria were routinely maintained in Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37°C. For this proteomic study, commercial bovine fetal serum (BFS) (Gibco) was used as integral culture medium, which was heated at 56°C for 30 min prior to use for inactivating complemental system proteins [9]. An overnight BHI culture (24 hours) of *C. pseudotuberculosis* was inoculated in triplicate (1:10) separately into 150 mL of pre-warmed BFS and incubated at 37°C, with agitation at 150 rpm; growth curves were monitored by optical density (OD) at 595 nm, and 100 ml of bacterial culture was retrieved at the mid-exponential growth phase (OD<sub>595 nm</sub> = 0.7). The bacterial pellets were recovered by centrifugation at 6,000 rpm for 20 min at 4°C, washed three times with sterile PBS, and the final pellets were stored at -70°C until used for membrane proteins extraction.

### **Membrane proteins extraction**

Considering the high abundance of glycolipids in the cell walls of all corynebacteria, a delipidation step was carried out to remove most of the lipoarabinomannans (LAMs) and phosphatidylinositol mannosides (PIMs) [34, 35]; thirty volumes of chloroform-methanol-water (1:2:0.8 [vol/vol/vol]) were added to each of the three frozen bacterial pellets and sonicated on ice for five cycle of 1 minute (60 Hz), with 30 seconds of intervals, followed by agitation during one hour in an orbital shaker at 150 rpm. The supernatant was recovered by centrifugation at 6,000 rpm for 20 min at 4°C, and the resulting pellet was subjected to same protocol twice more; supernatants of each extraction were pooled together and dried by rota-evaporation (50°C) for posterior glycolipid analysis. The final pellets were subjected to a low hydrophobicity membrane proteins extraction protocol [36], using 30 volumes of 9% 1-butanol for 3 h with shaking (150 rpm) at room temperature, followed by 6,000 rpm for 20 min at 4°C. The procedure was applied twice more, and the supernatants of each extraction were dried by rota-evaporation (50°C). The resulting protein extracts of each replicate were resuspended in sterile water and their protein concentration were determined by the Lowry method (DC-reagent Kit, Bio-Rad Laboratories) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### **Mass spectrometry**

To minimize biological variation in protein identification, the three protein extracts were pooled together for homogenization, and then shared into six equal replicates for

mass spectrometry analysis, as previously described [37]. Prior to mass spectrometry analysis, aliquots of 150  $\mu\text{g}$  in protein of each replicate were subjected to overnight acetone precipitation at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  to remove any contaminants. Protein precipitates were centrifuged at 13000 rpm for 20 minutes at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and after the acetone was removed, the resulting pellets were resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50 mM, pH 9.7). The material was reduced by incubation with 5  $\mu\text{L}$  of 200 mM dithiothreitol in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min and alkylated with 4  $\mu\text{L}$  of 500 mM iodoacetamide in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 45 min at room temperature in the dark; the reaction was halted with 5  $\mu\text{L}$  of 200 mM dithiothreitol in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Digestion was done using sequencing-grade trypsin (Promega Biotecnologia, São Paulo, SP, Brazil) at 1/50 (w/w) trypsin/protein at  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Tryptic peptides were desalted using Pierce C18 Spin Columns (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions [38].

Peptide separation was carried out by liquid chromatography (nanoACQUITY UPLC<sup>TM</sup>, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Peptides from the trypsin digest (3  $\mu\text{L}$ ) were loaded at a flow rate of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  onto a Symmetry C<sub>18</sub> trap column (Waters Corporation) for 2 min, using 0.1% formic acid (FA)/3% acetonitrile (ACN) in water as eluent. Peptides were eluted from the trap column with a step gradient using solvent B (0.1% FA in ACN) and separated on a BEH 130 C<sub>18</sub> column (Waters Corporation) at a flow rate of 0.6  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Mass detection of peptides was carried out on a hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro, Micromass, Alliedscienpro, Quebec, Canada) equipped with a nanoelectrospray Z spray source. Data directed analysis acquired in survey mode were processed using MassLynx (v 4.1, Waters Corporation) and raw files from the Q-TOF micro (MS-MS data) were converted into the PKL (peak list) format; the files of the six replicates were merged into one file for the search in databases (Additional file 1).

Searches employing MS-MS data were performed using the open-source software X!Tandem [39], which counts the number of matched ions and then calculates a score using the matched ions and their intensities. The search is done iteratively: only proteins, that have at least one peptide identified in an iteration, are searched in subsequent iterations. This iterative search can be used to speed up and increase the sensitivity of the identification. [40,41]. The search parameters included the enzyme entry set for trypsin, peptide tolerance of 100 ppm, fragment mass tolerance of 1.2 Da and the maximum number of missed cleavages to 1. Cysteine carbamido methylation

and methionine oxidation were set as fixed and variable modifications, respectively. Search results were validated through the Log of the E score; peptide spectrum matches were considered significant when the Log expectation value reported by X!Tandem was smaller than -3, meaning that the probability of a peptide match to be a false positive is less than 0.005.

### **Bioinformatics analysis**

Considering that the online X!Tandem pipeline used the proteomic databases from *C. pseudotuberculosis* strains 316, 3/99-5 and FRC41 (which are redundant proteomes) for protein identification, all respective homologous sequences were identified in the reference non-redundant proteomes of strains C231, Cp267 or E19, and the following bioinformatics analysis used sequences and accession numbers from such reference strains.

The identified proteins were submitted to prediction of subcellular localization in the CELLO2GO web server [42], which combines the CELLO localization-predicting and BLAST homology-searching approaches, as well as gene ontology (GO) information to map extracellular, cell wall, membrane, and cytoplasmic proteins. The overall accuracy for subcellular-localization prediction achieved by CELLO2GO is 99.4% for Gram-positive bacteria, with an E-value set up at 0.001 [43]. All the proteins were also submitted to prediction of protein topology in the TOPCONS web server [44], which identifies transmembrane and signal peptide regions and generates a consensus result; the prediction performance of TOPCONS has an accuracy of 87% [45]. The proteins that were *in silico* classified as exclusively intracellular or presented no transmembrane-helix or signal peptide were excluded for further predictions, since they were not considered as membrane associated. The pathogenic potential of the selected proteins was determined using the MP3 web server [46], which uses a combination of Support Vector Machines (SVM) and Hidden Markov Model (HMM) to identify amino acid sequences and protein domains of virulence factors. The program allows the user to analyze large amounts of data simultaneously, and the use of a threshold value of -0.2 provides high levels of sensitivity (92%), specificity (100%), and accuracy (96%) [47].

The proteins that were predicted to have pathogenic potential were submitted to a protein-protein interaction analysis using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING), version 10.0 (<http://string-db.org>), which

comprises known and predicted physical (direct) and functional (indirect) protein-protein interactions, derived by both experimental and computational techniques. The server applies a phylogenetic profiling algorithm that integrates sequence similarity and sequence interactions from 2031 organisms to perform the query prediction [48]. STRING in multiple sequences mode was used, and only interactions with high confidence levels ( $>0.700$ ) were kept, as recommended by the authors [49]. In order to characterize possible metabolic pathways in which the target pathogenic proteins are involved, a functional enrichment of the generated network was performed by allowing the String server include strategical protein interactors from *C. pseudotuberculosis* proteome to complete the main networks [50]. In the present study, an interaction network was constructed with the whole set of target protein, with the maximum number of interactors to show set up at 160 proteins (10 interactors per target protein). The enriched network was automatically benchmarked and calibrated against previous knowledge, using the high-level functional groupings provided by the manually curated Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway maps, and the final KEGG pathway maps involving the pathogenic target proteins were provided. In order to evaluate the importance of the each target protein node inside the network, each node was removed from input nodes one by one and the change in clustering coefficient and functional enrichment were analyzed, as previously described [51].

## References

1. Dorella FA, Gala-Garcia A, Pinto AC, Sarrouh B, Antunes CA, Ribeiro D, et al. Progression of “OMICS” methodologies for understanding the pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the Brazilian experience. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013; 6 (7):1-7.
2. Bastos BL, Portela RW, Dorella FA, Ribeiro D, Seyffert N, Castro TLP, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunol* 2012; S4 Suppl 5:1-15.
3. Pacheco LGC, Slade SE, Seyffert N, Santos AR, Castro TLP, Silva WM, et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiology*. 2011; 11(12):1-14.

4. Silva WM, Seyffert N, Ciprandi A, Santos AV, Castro TL, Pacheco LG, et al. Differential Exoproteome Analysis of Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar Ovis Strains Isolated from Goat (1002) and Sheep (C231). *Current Microbiology*. 2013a; 67(4):460-5.
5. Silva WM, Seyffert N, Santos AV, Castro TL, Pacheco LG, Santos AR, et al. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. *Microb Pathog*. 2013b; 61(62):37-42.
6. Seyffert N, Pacheco LGC, Silva WM, Castro TLP, Santos AV, Santos AR, et al. Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J integr OMICS*. 2011; 1(2):193-7.
7. Seyffert N, Silva RF, Jardim J, Silva WM, Castro TLP, Tartaglia N.R, et al, Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Vet Microbiol*. 2014; 174:255-260.
8. Silva WM, Carvalho RD, Soares SC, Bastos IFS, Folador EL, Souza GHMF, et al. Label-free proteomic analysis to confirm the predicted proteome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* under nitrosative stress mediated by nitric oxide. *BMC Genomics*. 2014; 15(1065):1-15.
9. Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H. Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(22):8097–8105.
10. Rees MA, Kleifeld O, Crellin PK, Ho B, Stinear TP, Smith AI, Coppel RL. Proteomic Characterization of a Natural Host–Pathogen Interaction: Repertoire of in Vivo Expressed Bacterial and Host Surface- Associated Proteins. *Journal of Proteome Research*. 2015; 14: 120-132.
11. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001; 19: 2688–2691.



12. Garmory HS and Titball RW. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infection and Immunity*. 2004; 72 (12): 6757–6763
13. Trost E, Ott L, Schneider J, Schröder J, Jaenicke S, Goesmann A, et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, 2010; 11(728):1-17.
14. Ruiz JC, D’Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC, Santos AR, et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*. 2011; 6(4):1-16.
15. Ribeiro D, Rocha F, Leite KM, Soares S, Silva A, Portela RW, et al. An ironacquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Vet Res*. 2014; 45(1):1-6.
16. Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; 208(1):41-5.
17. Moraes PM, Seyffert N, Silva WM, Castro TLP, Silva RF, Lima DD, et al. Characterization of the Opp Peptide Transporter of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and Its Role in Virulence and Pathogenicity. *BioMed Res Int*. 2014; 1-7, doi 10.1155/2014/489782.
18. Pinto AC, Sá PHCG, Ramos RTJ, Barbosa S, Barbosa HPM, Ribeiro AC, et al. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*. 2014; 15(14):1-14.
19. Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, et al. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96: 13294–13299.

20. Leclere V, Bechet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:4577–4584
21. Nasir MN, Besson F. Specific interactions of mycosubtilin with cholesterol-containing artificial membranes. *Langmuir.* 2011; 27: 10785–10792.
22. Serafini A, Pisu D, Palù G, Rodriguez GM, Manganelli R. The ESX-3 secretion system is necessary for iron and zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. 2013; 14;8(10):e78351.
23. Belardinelli R, Sharma H, Caliskan N, Cunha CE, Peske F, Wintermeyer W, Rodnina MV. Choreography of molecular movements during ribosome progression along mRNA. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2016; 23; 342–348.
24. Domenech P, Reed MB, Barry CE 3rd. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infection and Immunity.* 2005; 73(6):3492-501.
25. Varela C, Rittmann D, Singh A, Krumbach K, Bhatt K, Eggeling L, Besra GS, Bhatt A. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chemistry & Biology.* 2012; 20;19(4):498-506.
26. Boyne ME, Sullivan TJ, amEnde CW, Lu H, Gruppo V, Heaslip D, Amin AG, Chatterjee D, Lenaerts A, Tonge PJ, Slayden RA. Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against *Mycobacterium tuberculosis*: evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity InhA inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(10):3562-3567.
27. Vilchèze C, Hartman T, Weinrick B, Jacobs WR Jr. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nature Communications.* 2013; 4:1881.
28. Bannantine JP, Stabel JR, Laws E, D Cardieri MC, Souza CD. *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis Recombinant Proteins Modulate Antimycobacterial Functions of Bovine Macrophages. *PLoS One.* 2015; 15;10(6).

29. Jeon HS, Shin AR, Son YJ, Kim JM, Jang Y, Kim S, Lee KI, Choi CH, Park JK, Kim HJ. An evaluation of the use of immunoglobulin A antibody response against mycobacterial antigens for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *The Journal of Veterinary Diagnostic*. 2015; 27(3): 344-51.
30. Stones DH, Krachler AM. Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 23;16(2):2626-2640.
31. Ladomersky E, Petris MJ. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*. 2015; 7(6):957-64.
32. Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminatti R, Vale VLC, Paule BJA, Portela RW, et al. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008; 126(1-2):131-41.
33. Almeida S, Tiwari S, Mariano D, Souza F, Jamal SB,Coimbra N, et al, The genome anatomy *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. *Stand Gen Sci*. 2016; 11(29):1-8.
34. Crellin PK, Kovacevic S, Martin KL, Brammananth R, Morita YS, Billman JH, et al. Mutations in pinE restore lipoarabinomannan synthesis and growth in *Mycobacterium smegmatis* lbpW mutant. *J Bacteriol*. 2008; 190(10): 3690-99.
35. Rainczuk AK, Yamaryo-Botte Y, Brammananth R, Stinear TP, Seemann T, Coppel RL, et al. The lipoprotein LpqW is essential for the mannosylation of periplasmic glycolipids in *Corynebacteria*. *J Biol Chem*. 2012; 287(51):42726-38.
36. Giraldo M, Cannizzaro H, Ferguson MAJ, Almeida IC, Gazzinelli RT. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(4):1453-60.
37. Eshghi A, Cullen PA, Cowen L, Zuerner RL, Cameron CE. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. *J Proteome Res*. 2009; 8(10):4564-78.

38. Santos LN, Gallo MBC, Silva ES, Figueiredo CAV, Cooper PJ, Barreto ML, et al. A proteomic approach to identify proteins from extract with immunomodulatory effects. *Parasite Immunol.* 2013; 35(5-6):188-93.
39. [www.thegpm.org/tandem/](http://www.thegpm.org/tandem/). Accessed 20 Aug 2016.
40. Craig R, Beavis RC. A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17(20):2310–6.
41. Craig R, Beavis RC. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 2004; 20(9):1466–7.
42. <http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>. Accessed 22 Aug 2016.
43. Yu L, Luo J, Guo Y, Li Y, Pu X, Li M. In silico identification of gram negative bacterial secreted proteins from primary sequence. *Comput. Biol. Med.* 2013; 43(9):1177–81.
44. <http://topcons.cbr.su.se/>. Accessed 19 Aug 2016.
45. Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Kall L, Elofsson A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:401-07.
46. <http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/>. Accessed 21 Aug 2016.
47. Gupta A, Kapil R, Dhakan DB, Sharma VK. MP3: A Software Tool for the Prediction of Pathogenic Proteins in Genomic and Metagenomic Data. *PLoS ONE.* 2014; 9(4):1-11.
48. Von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: Known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33:43337.
49. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:447-52.
50. Raman K, Yeturu K, Chandra N. TargetTB: a target identification pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis. *BMC Syst Biol.* 2008; 2:109. DOI: 10.1186/1752-0509-2-109.

51. Hanh H, Kaufmann SHE. The Role of Cell-Mediated Immunity in Bacterial Infections. Rev Infect Dis. 1981; 3(6):1221-50.

Table 1. List of membrane associated proteins expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown directly in bovine fetal serum with their respective pathogenesis potential.

#	Protein names	Pathogenic potential	Gene names
1	ABC transporter ATP-binding protein	No	Cp267_1607
2	ABC-type transporter	No	CpC231_0292
3	Ascorbate-specific permease IIC component ulaA	No	ulaA CpC231_0082
4	Carbon starvation protein A	No	pcsA CpC231_1630
5	Copper-containing nitrite reductase	No	aniA CpC231_0563
6	Cytochrome c biogenesis protein resB	No	resB CpC231_1838
7	L-Lysine transport protein	No	lysI CpC231_0710
8	Na(+)/H(+) antiporter subunit G	No	mrpG1 CpC231_1809
9	Serine transporter	No	sdaC CpC231_0369
10	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	No	dsbA CpC231_0272
11	Two component system sensor kinase protein	No	tcsS4 CpC231_0660
12	Uncharacterized protein	No	CpC231_0441a
13	UPF0721 transmembrane protein	No	CpC231_0080
14	Iron ABC transporter substrate-binding protein	Yes	ciuA CpC231_0982
15	FagA protein	Yes	fagA CpC231_0028
16	Oligopeptide-binding protein oppA	Yes	oppA4 CpC231_1167
17	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	Yes	oppCD2 CpC231_2060
18	Mycosubtilin synthase subunit B	Yes	mycB CpC231_1794
19	ESX-3 secretion system protein eccC3	Yes	eccC3 CpC231_0404
20	ABC transporter inner membrane protein	Yes	CpC231_1467
21	Transmembrane transport protein MmpL	Yes	mmpL CpC231_1939
22	LpqU family protein	Yes	lpqU CpC231_0712
23	Surface antigen	Yes	CpC231_0173
24	Copper resistance D domain-containing protein/Cytochrome c oxidase caa3 assembly factor (Caa3_CtaG)	Yes	copD CpC231_1627
25	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_0196
26	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_0252
27	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_1761
28	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_1862
29	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_1904
30	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_2052
31	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_0195
32	Uncharacterized protein	Yes	CpE19_0622
33	Uncharacterized protein	Yes	CpC231_0905
34	Uncharacterized protein	Yes	CpE19_1910
35	UPF0182 protein CpC231_0555	Yes	CpC231_0555



Sequenced proteins by LC-MS/MS analysis identified by GPM pipeline									Uniprot annotation information				Prediction using Cello2GO software	Prediction using TopCons software	
rank	log(e)	log(I)	% (measured)	% (corrected)	unique	total	Mr	GI List from GPM	Uniprot entry	Protein names	Gene names	Protein Length	Subcellular localization	Number of transmembrane helices	Presence of signal peptide
1	-59.5	5.41	4.5	7	6	9	322.0	gi 379715936	D9QC32	Fatty acid synthase	fas CpC231_1646	3032	Cell wall	0	No
2	-35.0	5.05	11	14	3	5	35.7	gi 379715928	D9QC25	Oxidoreductase	CpC231_1639	332	Membrane	0	No
3	-34.2	5.24	12	21	3	6	51.6	gi 379716141	D9QCL8	Cytochrome c biogenesis protein resB	resB CpC231_1838	466	Membrane	4	No
4	-33.6	4.93	4.7	8	3	5	171.8	gi 379716232	D9QCX0	Phthiocerol synthesis polyketide synthase type I PpsA	ppsA CpC231_1945	1611	Cell wall	0	No
5	-32.6	5.05	6.3	8	3	6	122.8	gi 375289673	D9QDB6	Uncharacterized protein	CpC231_2052	1135	Cell wall	1	Yes
6	-24.9	4.60	14	49	2	3	48.5	gi 375287948	D9QED8	Serine transporter	sdaC CpC231_0369	447	Membrane	11	No
7	-23.9	4.33	15	24	2	2	41.1	gi 300859309	D9QCR1	Alcohol dehydrogenase GroES-like protein	adhA CpC231_1883	385	Cytoplasmic	0	No
8	-21.8	4.78	16	22	2	4	23.5	gi 379716180	D9QCR6	Protein GrpE (HSP-70 cofactor)	grpE CpC231_1889	214	Cytoplasmic	0	No
9	-20.6	5.60	9.5	11	2	9	57.5	gi 379715626	D9QB70	Signal recognition particle protein (Fifty-four homolog)	ffh CpC231_1324	535	Cytoplasmic	0	No
10	-20.4	4.49	84	98	2	2	5.9	gi 379714488	D9QDX6	Uncharacterized protein	CpC231_0205	51	Extracellular	0	No
11	-20.4	4.27	12	14	2	3	43.9	gi 375288564	D9QA74	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	bioA CpC231_0972	432	Membrane	0	No
12	-20.0	5.07	19	27	2	4	30.8	gi 375287851	D9QE43	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	dsbA CpC231_0272	293	Extracellular	0	Yes
13	-19.2	4.57	8.4	12	2	3	37.8	gi 379714582	D9QE73	o-succinylbenzoate synthase (OSB synthase) (OSBS) (EC 4.2.1.113) (4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxybutyric acid synthase) (o-succinylbenzoic acid synthase)	menC CpC231_0302	345	Cytoplasmic	0	No
14	-18.6	5.18	7.6	18	2	2	95.0	gi 379714840	D9QEX7	Copper-containing nitrite reductase	aniA CpC231_0563	877	Membrane	13	No
15	-18.4	5.02	14	18	2	3	47.7	gi 375287778	D9QDW8	Uncharacterized protein	CpC231_0196	468	Extracellular	0	Yes

16	-17.0	4.74	4.4	6	2	4	59.7	gi 375288505	D9QA21	Dihydroxyacetone kinase 2	dak2 CpC231_0918	571	Membrane	0	No
17	-16.5	4.66	8.0	10	2	3	43.3	gi 379714513	D9QE02	DNA polymerase III subunit gamma/tau	dnaX CpC231_0231	400	Cytoplasmic	0	No
18	-16.4	4.73	8.6	23	2	3	48.1	gi 379714482	D9QDW7	Uncharacterized protein	CpC231_0195	477	Extracellular	5	Yes
19	-15.6	4.79	16	31	2	4	29.5	gi 375287832	D9QE23	Uncharacterized protein	CpC231_0252	282	Membrane	1	No
20	-15.5	4.39	27	41	2	3	24.5	gi 375289516	D9QCT0	Uncharacterized protein	CpC231_1904	218	Membrane	2	No
21	-15.3	4.16	9.1	11	2	2	57.4	gi 379716364	D9QDE3	Bifunctional indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosylanthranilate isomerase	trpC CpC231_2079	495	Membrane	0	No
22	-15.3	5.26	3.1	5	2	4	135.7	gi 379716096	D9QCH4	Mycosubtilin synthase subunit B	mycB CpC231_1794	1276	Cell wall	10	No
23	-15.1	5.18	8.2	10	2	4	59.4	gi 300858660	D9QAY4	GTPase HflX (GTP-binding protein HflX)	hflX CpC231_1235	546	Cytoplasmic	0	No
24	-15.1	4.46	5.5	8	2	3	101.9	gi 379715882	D9QBY5	Para-aminobenzoate synthase component I	pabB CpC231_1599	934	Cytoplasmic	0	No
25	-15.0	5.28	39	39	1	2	7.3	gi 379714509	D9QDZ8	Cold-shock protein	cspA CpC231_0227	67	Cytoplasmic	0	No
26	-14.7	5.48	3.8	5	2	7	108.8	gi 379714837	D9QEW9	UPF0182 protein CpC231_0555	CpC231_0555	1010	Membrane	7	No
27	-13.6	4.97	4.4	6	2	4	108.3	gi 379714510	D9QDZ9	DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2) (DNA topoisomerase I)	topA CpC231_0228	984	Cytoplasmic	0	No
28	-13.1	5.00	13	17	2	6	38.5	gi 379715438	P96749	3-dehydroquinase synthase (EC 4.2.3.4)	aroB CpC231_1138	359	Cytoplasmic	0	No
29	-13.1	4.76	13	14	2	4	41.1	gi 379715600	D9QB45	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin) (EC 1.17.7.3) (1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase)	ispG CpC231_1298	391	Cytoplasmic	0	No
30	-12.8	4.36	8.8	10	2	4	52.7	gi 379716028	D9QCB1	Adenylosuccinate lyase (ASL) (EC 4.3.2.2) (Adenylosuccinase)	purB CpC231_1727	479	Cytoplasmic	0	No
31	-12.5	4.47	6.6	7	1	2	53.6	gi 379716075	D9QCF4	Betaine aldehyde dehydrogenase	gbsA CpC231_1773	501	Cytoplasmic	0	No
32	-12.3	4.06	4.9	7	1	1	57.9	gi 379714465	D9QDU8	Catalase	katA CpC231_0176	512	Extracellular	0	No
33	-11.1	4.44	5.8	7	1	2	46.1	gi 379715674	D9QBB6	L-threonine dehydratase (EC 4.3.1.19) (Threonine deaminase)	ilvA CpC231_1371	434	Cytoplasmic	0	No



34	-9.8	4.93	2.4	4	1	5	94.5	gi 379716227	D9QCW4	Transmembrane transport protein MmpL	mmpL CpC231_1939	874	Membrane	12	No
35	-9.4	4.72	6.8	10	1	1	58.8	gi 379714775	D9QEQ5	Propionyl-CoA carboxylase beta chain 2	pccB2 CpC231_0491	547	Cytoplasmic	0	No
36	-9.3	4.60	13	17	1	2	27.2	gi 379714914	D9Q990	3'-phosphoadenosine 5'-phosphate phosphatase	cysQ CpC231_0633	294	Cytoplasmic	0	No
37	-9.2	3.87	3.4	4	1	2	63.1	gi 379714766	D9QEP4	Acyl coenzyme A carboxylase	accBC CpC231_0480	591	Cytoplasmic	0	No
38	-8.9	4.65	17	26	1	2	16.2	gi 379714367	D9QDK0	Multiple antibiotic resistance protein marR	marR CpC231_0075	138	Cytoplasmic	0	No
39	-8.9	3.68	17	28	1	2	17.8	gi 300857859	F9Y340	Uncharacterized protein	CpC231_0441a	160	Extracellular	0	Yes
40	-8.7	4.20	4.7	6	1	2	56.4	gi 379714942	D9Q9B7	Two component system sensor kinase protein	tcsS4 CpC231_0660	514	Membrane	2	No
41	-8.6	4.22	9.3	15	1	1	25.0	gi 379714802	D9QET3	DNA-binding response regulator mtrA	mtrA CpC231_0519	232	Cytoplasmic	0	No
42	-8.5	4.28	9.0	11	1	1	32.9	gi 379715613	D9QB56	Tyrosine recombinase XerC	xerC CpC231_1310	293	Cytoplasmic	0	No
43	-8.4	3.87	6.4	7	1	1	36.8	gi 375288626	D9QAD1	Protein pafC	pafC CpC231_1030	329	Cytoplasmic	0	No
44	-8.2	4.54	12	19	1	2	20.2	gi 379714423	D9QDQ6	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxT (EC 4.3.3.6) (Pdx2) (Pyridoxal 5'-phosphate synthase glutaminase subunit)	pdxT CpC231_0132	188	Cytoplasmic	0	No
45	-8.2	3.77	23	34	1	1	7.3	gi 379715760	D9QBL4	Uncharacterized protein	CpC231_1473	69	Cytoplasmic	0	No
46	-8.2	5.48	5.8	6	1	1	46.7	gi 379715385	D9QAI6	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7)	csdA CpC231_1086	429	Cytoplasmic	0	No
47	-8.0	4.49	7.7	12	1	2	32.1	gi 379715634	D9QB78	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fapy-DNA glycosylase) (EC 3.2.2.23) (DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase MutM)	mutM1 fpg mutM CpC231_1332	285	Membrane	0	No
48	-7.7	4.42	3.5	12	1	1	81.7	gi 379715914	D9QC16	Carbon starvation protein A	pcsA CpC231_1630	761	Membrane	16	No
49	-7.6	4.42	2.7	3	1	2	116.9	gi 375287756	D9QDU5	Surface antigen	CpC231_0173	1071	Cell wall	2	No
50	-7.6	3.77	3.3	5	1	1	106.6	gi 379716328	D9QDA6	Leucine--tRNA ligase (EC 6.1.1.4) (Leucyl-tRNA synthetase)	leuS CpC231_2042	953	Cytoplasmic	0	No
51	-7.6	3.82	5.0	7	1	1	59.9	gi 379714559	D9QE49	Uroporphyrinogen-III synthase	hemD CpC231_0278	562	Cytoplasmic	0	No

52	-7.5	5.50	8.7	12	1	1	40.1	gi 375288661	D9QAG1	Arginine/ornithine transport system ATPase	CpC231_1061	365	Cytoplasmic	0	No
53	-7.4	5.02	5.4	6	1	4	46.4	gi 300858968	A0A0N1SMY1	ABC transporter ATP-binding protein	Cp267_1607	615	Membrane	2	No
54	-7.4	4.46	13	14	1	2	15.7	gi 375288761	D9QAR2	Probable thiol peroxidase (EC 1.11.1.-)	tpx CpC231_1162	168	Cytoplasmic	0	No
55	-7.4	3.77	6.2	7	1	1	43.7	gi 375289478	D9QCP1	Uncharacterized protein	CpC231_1862	403	Extracellular	0	Yes
56	-7.4	3.86	14	21	1	1	26.0	gi 379714403	D9QDN7	Manganese/zinc/iron transport system ATP-binding protein	mntB CpC231_0112	241	Membrane	0	No
57	-7.4	4.79	7.4	9	1	2	36.6	gi 379714788	D9QER8	dTDP-Rha:alpha-D-GlcNAc-pyrophosphate polyprenol, alpha-3-L-rhamnosyltransferase	wbbL CpC231_0504	316	Extracellular	0	No
58	-7.4	4.79	4.2	5	1	4	63.7	gi 379715120	D9Q9U1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	lcfA2 CpC231_0836	577	Membrane	0	No
59	-7.3	4.88	4.6	6	1	2	74.9	gi 379714289	D9QD60	DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3)	gyrB CpC231_0005	681	Cytoplasmic	0	No
60	-7.3	4.01	8.9	26	1	2	27.1	gi 300857499	D9QDK5	UPF0721 transmembrane protein	CpC231_0080	270	Membrane	9	No
61	-7.1	4.19	4.4	6	1	1	80.4	gi 379715121	D9Q9U2	Transcription termination factor Rho (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase Rho)	rho CpC231_0837	714	Cell wall	0	No
62	-7.1	5.15	3.5	6	1	3	72.7	gi 379716344	D9QDC4	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	oppCD2 CpC231_2060	677	Membrane	6	No
63	-7.1	3.81	16	25	1	1	24.5	gi 379714721	D9QEK0	Two-component system transcriptional regulatory protein	tcsR3 CpC231_0434	225	Cytoplasmic	0	No
64	-7.0	3.79	9.3	12	1	1	39.6	gi 379715122	D9Q9U3	Peptide chain release factor 1 (RF-1)	prfA CpC231_0838	356	Cytoplasmic	0	No
65	-7.0	4.58	8.0	10	1	1	41.8	gi 300858398	D9QA77	Pseudouridine synthase (EC 5.4.99.-)	rluB CpC231_0975	373	Cytoplasmic	0	No
66	-6.9	4.60	5.0	6	1	1	54.7	gi 375288467	D9Q9Y5	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B (Asp/Glu-ADT subunit B) (EC 6.3.5.-)	gatB CpC231_0880	501	Cytoplasmic	0	No
67	-6.9	5.34	9.4	15	1	2	40.5	gi 379715022	D9Q9J4	Fructose-1,6-bisphosphatase	glpX CpC231_0738	336	Cytoplasmic	0	No
68	-6.8	4.37	7.3	8	1	2	27.7	gi 379714994	D9Q9G8	LpqU family protein	lpqU CpC231_0712	261	Extracellular	1	No
69	-6.8	4.32	20	22	1	2	15.3	gi 379715295	D9QA97	Oxoglutarate	odhI CpC231_0995	143	Cytoplasmic	0	No

										dehydrogenase inhibitor						
70	-6.8	4.24	3.7	10	1	2	74.7	gi 379715912	D9QC13	Copper resistance D domain-containing protein/Cytochrome c oxidase caa3 assembly factor (Caa3_CtaG)	copD CpC231_1627	681	Membrane	16	No	
71	-6.7	4.46	4.9	6	1	2	56.1	gi 375288812	D9QAV8	Methyltransferase	CpC231_1209	508	Cytoplasmic	0	No	
72	-6.7	5.45	2.6	4	1	9	102.0	gi 375288673	D9QAH4	Aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3)	acnA CpC231_1074	939	Cytoplasmic	0	No	
73	-6.7	4.49	8.4	9	1	2	28.9	gi 379715650	D9QB92	Indole-3-glycerol phosphate synthase	trpC2 CpC231_1347	273	Cytoplasmic	0	No	
74	-6.7	5.18	9.9	21	1	1	36.2	gi 300857449	D9QD83	Uncharacterized protein	fagA CpC231_0028	355	Membrane	9	No	
75	-6.6	4.79	2.4	3	1	1	85.0	gi 379715466	D9QAR5	GTP pyrophosphokinase	relA CpC231_1165	759	Cytoplasmic	0	No	
76	-6.4	4.68	17	19	1	2	21.6	gi 379715439	D9QAN9	Shikimate kinase (SK) (EC 2.7.1.71)	aroK CpC231_1139	198	Cytoplasmic	0	No	
77	-6.4	3.86	8.4	14	1	1	42.4	gi 379714286	D9QD57	DNA polymerase III subunit beta (EC 2.7.7.7)	dnaN CpC231_0002	395	Cytoplasmic	0	No	
78	-6.4	4.90	14	16	1	1	23.7	gi 300857890	D9QEN6	Uracil phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.9) (UMP pyrophosphorylase) (UPRTase)	upp CpC231_0472	211	Cytoplasmic	0	No	
79	-6.4	5.12	11	13	1	1	23.5	gi 379714734	D9QEL3	DtxR family transcriptional regulator	mntR CpC231_0447	213	Cytoplasmic	0	No	
80	-6.3	4.08	9.8	14	1	2	20.9	gi 379714899	A0A0K0VS53	Uncharacterized protein	CpE19_0622	193	Extracellular	1	No	
81	-6.3	4.03	7.9	10	1	2	34.9	gi 379714573	D9QE63	ABC-type transporter	CpC231_0292	328	Extracellular	0	Yes	
82	-6.3	4.60	4.6	7	1	2	75.5	gi 375288694	D9QAJ6	Transketolase (EC 2.2.1.1)	tkt CpC231_1096	697	Cytoplasmic	0	No	
83	-6.2	4.65	12	22	1	2	30.2	gi 379714736	D9QEL5	Bifunctional protein FolD	folD CpC231_0449	281	Cytoplasmic	0	No	
84	-6.2	4.54	9.0	12	1	2	30.0	gi 375288574	D9QA84	Iron ABC transporter substrate-binding protein	ciuA CpC231_0982	301	Membrane	0	Yes	
85	-6.1	4.30	16	17	1	1	16.7	gi 379715411	D9QAL1	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (DMRL synthase) (LS) (Lumazine synthase) (EC 2.5.1.78)	ribH CpC231_1111	157	Cytoplasmic	0	No	
86	-5.9	3.63	4.3	7	1	1	54.0	gi 379715904	D9QC06	Nitroreductase	CpC231_1620	492	Extracellular	0	No	
87	-5.8	4.50	22	38	1	1	13.0	gi 379716112	D9QCI9	Na(+)/H(+) antiporter subunit G	mrpG1 CpC231_1809	120	Membrane	3	No	

88	-5.4	4.19	6.8	8	1	2	41.4	gi 379716001	D9QC85	tRNA-dihydrouridine synthase (EC 1.3.1.-)	CpC231_1700	384	Cytoplasmic	0	Yes
89	-5.4	4.22	8.3	9	1	2	34.9	gi 379715878	D9QBY2	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	mdh CpC231_1596	326	Cytoplasmic	0	No
90	-5.3	4.48	5.8	10	1	2	46.2	gi 375289377	D9QCE2	Uncharacterized protein	CpC231_1761	433	Membrane	11	No
91	-5.2	4.66	7.9	10	1	2	34.6	gi 379715335	D9QAD9	RecB family nuclease	recB CpC231_1038	303	Cytoplasmic	0	No
92	-5.2	4.45	52	58	1	1	4.8	gi 375288657	F9Y366	Uncharacterized protein	CpC231_1057a	42	Extracellular	0	No
93	-5.0	4.51	3.9	11	1	3	50.5	gi 375289073	D9QBK8	ABC transporter inner membrane protein	CpC231_1467	484	Membrane	10	No
94	-4.9	4.09	2.0	2	1	4	139.4	gi 379714686	D9QEH1	ESX-3 secretion system protein eccC3	eccC3 CpC231_0404	1283	Cell wall	1	No
95	-4.7	4.64	4.4	6	1	4	58.4	gi 379715468	D9QAR7	Oligopeptide-binding protein oppA	oppA4 CpC231_1167	546	Membrane	0	Yes
96	-4.7	3.88	4.2	8	1	2	54.1	gi 379715318	D9QAC2	Precorrin-3B C(17)-methyltransferase	cobJ CpC231_1021	501	Cytoplasmic	0	No
97	-4.6	3.88	4.2	19	1	1	53.5	gi 379714992	D9Q9G6	L-Lysine transport protein	lysI CpC231_0710	496	Membrane	13	No
98	-4.5	3.99	14	20	1	1	27.9	gi 379716182	A0A0K0VWV3	Uncharacterized protein	CpE19_1910	261	Extracellular	1	Yes
99	-4.5	3.86	7.2	8	1	1	38.9	gi 375288331	D9Q9K1	Ribosome-binding ATPase YchF	ychF CpC231_0745	361	Cytoplasmic	0	No
100	-4.4	4.33	12	13	1	1	23.7	gi 379715779	D9QBN2	Phosphoglycolate phosphatase	pgp CpC231_1492	214	Cytoplasmic	0	No
101	-4.2	4.60	4.8	6	1	2	60.6	gi 379715045	D9Q9L8	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	oppD2 CpC231_0762	558	Membrane	0	No
102	-4.1	5.46	2.3	11	1	4	52.6	gi 379714374	D9QDK7	Ascorbate-specific permease IIC component ulaA	ulaA CpC231_0082	513	Membrane	11	No
103	-4.1	4.47	4.2	6	1	1	46.3	gi 375289457	D9QCM2	Adenylosuccinate synthetase (AMPSase) (AdSS) (EC 6.3.4.4) (IMP--aspartate ligase)	purA CpC231_1842	428	Cytoplasmic	0	No
104	-4.1	4.53	4.0	6	1	2	37.2	gi 379715514	D9QAW0	RNA polymerase sigma factor	sigB CpC231_1211	329	Cytoplasmic	0	No
105	-4.1	4.12	3.9	4	1	1	56.6	gi 379715112	D9Q9T3	Lactate utilization protein B	lutB CpC231_0828	514	Cytoplasmic	0	No
106	-4.0	3.93	5.7	7	1	2	36.2	gi 379715830	D9QBT4	Uncharacterized protein	yvbT CpC231_1546	331	Cytoplasmic	0	No
107	-4.0	4.30	1.1	1	1	2	149.3	gi 379715525	D9QAX0	ATP-dependent RNA helicase hrpA	hrpA CpC231_1221	1332	Cell wall	0	No
108	-3.6	4.38	26	30	1	2	10.5	gi 300857951	D9QEU9	Anti-sigma factor	CpC231_0535	93	Cytoplasmic	0	No

109	-3.6	4.84	7.8	10	1	1	39.2	gi 379714970	D9Q9E6	Enoyl-CoA hydratase	echA CpC231_0690	355	Cytoplasmic	0	No
110	-3.5	3.98	3.5	4	1	1	58.9	gi 379715382	D9QAI3	ABC transporter ATP-binding protein	CpC231_1083	543	Cytoplasmic	0	No
111	-3.3	4.61	6.2	8	1	2	49.6	gi 379715193	D9QA08	Uncharacterized protein	CpC231_0905	469	Extracellular	0	Yes
112	-3.3	4.04	5.2	6	1	2	44.5	gi 379715691	D9QBD2	Cell division protein FtsZ	ftsZ CpC231_1387	409	Cytoplasmic	0	No
113	-3.2	4.41	3.2	4	1	2	40.0	gi 379715190	D9QA05	Menaquinone-specific isochorismate synthase	menF CpC231_0902	372	Cytoplasmic	0	No
114	-3.1	3.23	1.5	2	1	1	135.8	gi 379715082	D9Q9Q4	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	odhA CpC231_0798	1228	Cytoplasmic	0	No
115	-3.1	3.99	2.6	3	1	2	55.2	gi 379715592	D9QB39	Probable malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.4) (MQO) (Malate dehydrogenase [quinone])	mgo CpC231_1291	499	Cytoplasmic	0	No
116	-3.1	4.87	2.4	3	1	2	33.4	gi 379715006	D9Q9H8	Mycothioliol S-conjugate amidase (EC 3.5.1.115)	mca CpC231_0722	296	Cytoplasmic	0	No

Additional file 2. List of identified proteins in LC-MS/MS analysis and respective bioinformatics analysis.

## 7. Conclusão

O presente trabalho aplicou a *Corynebacterium pseudotuberculosis* técnicas de biotecnologia avançadas, nas áreas de Microbiologia e Imunologia, que são comumente empregadas em pesquisas com outras bactérias. Dessa forma, geramos mais informações para preencher algumas lacunas existentes com relação a Linfadenite Caseosa, não somente produzindo ciência básica, a qual servirá de fundamento para pesquisas posteriores, mas como também ciência aplicada, através da visualização de possíveis moléculas virulentas em condição que se assemelhem ao máximo as condições *in vivo*:

Frente ao protocolo experimental desenvolvido e aos resultados obtidos, conclui-se que:

- A combinação das técnicas de extração de moléculas hidrofóbicas por solventes orgânicos e de cromatografia de interação hidrofóbica foi efetiva em gerar soluções antigênicas semi-purificadas da cepa de *C. pseudotuberculosis* VD57;
- Condições de cultivo diferentes resultaram em distintos padrões de indução dessas moléculas.
- O reconhecimento antigênico por IgG das moléculas de 59 kDa e 25 kDa, que estão positivamente associadas à ocorrência de lesões em outros estudos.
- A fração, por só conter antígenos do micro-organismo pode possuir um bom potencial imunoprotetor.
- A fração dos antígenos de membrana, demonstrou bom potencial na utilização em imunodiagnóstico.
- Embora não se possa inferir que o cultivo no Soro Fetal Bovino se aproxima das condições de infecção no hospederio, este modelo de cultivo contribuiu para expressão diferencial de moléculas da membrana de *C. pseudotuberculosis* associadas a membrana, destacando-se o *ciuA* e *Opp*, que foram associados a Transportadores ABC, que tem grande importância para os mecanismos de crescimento e virulência de *C. pseudotuberculosis*.
- Proteínas que apareceram nas eletroforeses que já são bem conhecidas como PLD e Catalase A, e mais algumas possivelmente ainda não identificadas.

- A produção de um meio que mimetize as condições encontradas pela bactérias no animal, apresentou características de crescimento e de expressão proteica diferente dos demais meios.
- A partir do processo de extração de moléculas da bactéria é possível produzir testes mais eficazes e possível imunógenos.

## 8. Perspectivas futuras

O conhecimento de moléculas virulentas que sejam expressas em condições que se assemelhem ao máximo as condições *in vivo*, poderá vir a auxiliar na produção de uma metodologia de diagnóstico mais confiável, e acessível aos produtores e profissionais da área de saúde animal, será extremamente útil para evitar que animais infectados possam ser introduzidos em rebanhos. Além disso, um mecanismo vacinal eficiente servirá de ajuda importante aos produtores, pois a criação de ovinos e caprinos tem uma característica extensiva marcante, o que poderia sujeitar os animais a infecção a campo.

Para isso:

- As moléculas expressas nos diferentes meios, devem ser identificadas e melhor estudadas:

-Avaliar através de Western-Blot, se anticorpos de animais positivos as reconhecem.

-Testadas *in vitro* utilizando sangue total de ovinos e caprinos para caracterização do perfil de produção de citocinas induzido após 24h, 48h e 72h.

-Testadas *in vivo*.

-Utilizadas na produção de novos testes diagnóstico, que sejam mais rápidos, fáceis de serem feitos e sobretudo tenham um baixo custo.



## 9. REFERÊNCIAS

- Abdala, L. (2011). Teste de diferentes fontes de nitrogênio para o crescimento de espécies *Dunaliella tertiolecta* e *Chlorella sp.* / Luiza Abdala. –Porto Alegre, 2011. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Engenharia Química.
- Ahrens, C.H., Brunner, E., Qeli, E., Basler, K., Aebersold, R. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, p. 789-801, 2010.
- Alves, F.S.F. & Pinheiro, R.R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. Sociedade Nacional de Agricultura, [S.l.], ano 100, 1997.
- Andrews, P. C. a. S. C. Iron uptake and homeostasis in microorganisms, Norfolk, 2010.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., Rodriguez-Quinones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 215-237, 2003.
- Baird, G.J., Fontaine, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*. v. 137, p. 179-210. 2007.
- Barbosa, E.B., Vidotto, A., Polachini, G.M., Henrique, T, de Marqui, A.B.T., Tajara, E.H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, p. 366-375, 2012.
- Bargen, K.V., Wohlmann, J., Taylor, G. A., Utermöhlen, O., Haas, A. Nitric oxide-mediated intracellular growth restriction of pathogenic *Rhodococcus equi* can be prevented by iron. *Infection and immunity*, v. 79, n.5, p. 2098-2111, 2011.
- Barry, S. M. & Challis, G. L. Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 13, v.205-215, 2009.
- Bastos, B.L. (2011). Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de *Quillaja saponaria* como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico. Salvador, 2011. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-graduação em Imunologia.
- Bastos, B.L., Portela, R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, T.L.P., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Meyer, R., Azevedo, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *Journal Clinical Cellular Immunology* S4:005. 2012.
- Benjamin, J. A., Desnoyers, G., Morissette, A., Salvail, H., Masse, E. Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 88, p. 264-72, 2010.
- 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 Microbiology Letters*, v. 208, p. 41–45, 2002.

- Binns, S.H., Green, L.E., Bailey, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*, v. 123, p. 169–179, 2007.
- Boland, C.A. & Meijer, W.G. The iron dependent regulatory protein IdeR (DTxR) of *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 191, p. 1-5, 2000.
- Braithwaite, C.E., Smith E.E., Songer, J.G., Reine, A.H. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, v.38, p.59-70, 1993.
- Braun, V. & Hantke, K. Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, p. 328-334. 2011.
- Brown, J.S., Gilliland, S.M., Holden, D.W. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Molecular Microbiology*, v. 40, p. 572-585, 2001a.
- Brown, J.S., Ogunniyi, A.D., Woodrow, M.C., Holden, D.W., Paton, J.C. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*, v. 69, p. 6702-6706, 2001b.
- Carne, H.R. & Onon, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature*, v. 271, p. 246-248, 1978.
- Carpenter, B. M., Whitmire, J. M., Merrell, D. S. This Is Not Your Mother's Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 77, p. 2590-2601, 2009.
- Chan, D. I. & Vogel, H. J. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal*, v. 430, p. 1-19, 2010.
- Chen, Y.; Cheng, J. J.; Creamer, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology*, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 2008.
- Chu, B. C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., Slavinskaya, Z., Vogel, H. J. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals*, v. 23, p. 601-611. 2010.
- Cornelis, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, p. 1637-1645, 2010.
- Cosma, C.L., Sherman, D.R., Ramakrishnan, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 57, p. 641-76, 2003.
- Coyle, M.B., Lipsky, B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *American Society for microbiology*, v. 3, n. 3, p. 227-246, 1990.
- Craig, R., Beavis, R.C. A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 17, p.2310–6, 2003.

- Craig, R., Beavis, R.C. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*, v. 20, p. 1466–7, 2004.
- Cronjé, L., Edmondson, N., Eisenach, K.D., Bornman, L. Iron and iron chelating agents modulate *Mycobacterium tuberculosis* growth and monocyte-macrophage viability and effector functions. *FEMS Immunology and medical microbiology*, v. 45, p. 103-112, 2005.
- Crosa, J. H. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p.319-336, 1997.
- da Silva Neto, J. F., Braz, V. S., Italiani, V. C., Marques, M. V. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, v. 37, p. 4812-4825, 2009.
- D'afonseca, V., Moraes, P. M. R. O., 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*, v.7, p.252 – 260, 2008.
- Dorella, F. A. , Estevam, E. M. , Pacheco, L. G. , Guimaraes, C. T. , Lana, U. G. , Barsante, M. M. , Oliveira, S. C. , Meyer, R. , Mioshy, A. , Azevedo, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7368-7372, 2006a.
- Dorella, F.A., Estevam, E.M., Pacheco, L.G.C., Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Gomes, E.A., Barsante, M.M., Oliveira, S.C., Meyer, R, Miyoshi, A, Azevedo, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7368–7372, 2006.
- Eshghi, A., Cullen, P.A., Cowen, L., Zuerner, R.L., Cameron, C.E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. *Journal of Proteome Research*, v. 8, p. 4564-78, 2009.
- Franceschini, A., Lin, J., Von Mering, C., Jesen, L.J. SVD-phy: improved prediction of protein functional associations through singular value decomposition of phylogenetic profiles. *Bioinformatics*, v.32, p. 1–3, 2015.
- Ganz, T. & Nemeth, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, p. 500-510, 2015.
- Gupta, A., Kapil, R., Dhakan, D.B., Sharma, V.K. MP3: A Software Tool for the Prediction of Pathogenic Proteins in Genomic and Metagenomic Data. *PLoS ONE*, v. 9, p. 1-11, 2014.
- Handman, E. *Leishmania* vaccines: Old and new. *Parasitology Today*, v. 13, v. 236-238, 1997.

- Hantke, K. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, p. 172-177, 2001.
- Hard, G. C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *Infection and Immunity*, v. 12, p. 1439-1449, 1972.
- Heinrichs, J.H., Gatlin, L.E., Kunsch, C., Choi, G.H. And Hanson, M.S. Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 1436-1443, 1999.
- Hilbi, H. & Haas, A. Secretive bacterial pathogens and the secretory pathway. *Traffic*, v. 13, p. 1187-1197. 2012.
- Hodgson, A.L., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L.A., Mccoll, M., Cameron, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, v.17, p.802–808, 1999.
- 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. *Infection and immunity*, v. 60, n. 7, p. 2900-2905, 1992.
- Hood, M. I. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, p.525-537, 2012.
- <http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>. Accessed 22 Aug 2016.
- <http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/>. Accessed 21 Aug 2016.
- <http://string-db.org>. Accessed 20 Aug 2016.
- <http://topcons.cbr.su.se/>. Accessed 19 Aug 2016.
- [http://weizhongli-lab.org/cdhit\\_suite/cgi-bin/index.cgi](http://weizhongli-lab.org/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi). Accessed 19 Aug 2016.
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., Li, W.. CD-HIT suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, v. 26, p. 680-82, 2010.
- Jackson, L. A., Ducey, T. F., Day, M. W., Zaitshik, J. B., Orvis, J., Dyer, D. W. Transcriptional and functional analysis of the *Neisseria gonorrhoeae* Fur regulon. *Journal of Bacteriology*, v. 192, p. 77-85, 2010.
- Janagama, H., Kumar, S., Bannantine, J.P., Kugadas, A., Jagtap, P., Higgins, L.A., Witthuhn, B.A., Sreevatsan, S. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology*, v. 10, n.268, p. 1-11, 2010.
- Jensen, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of posttranslational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 8, p. 33-41, 2004.

- Jolly, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 29, p. 189-196, 1966.
- Jones, A. M. & Wildermuth, M. C. The Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Has Three High-Affinity Iron-Scavenging Systems Functional under Iron Limitation Conditions but Dispensable for Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, v. 193, p. 2767-2775, 2011.
- Kaufmann, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature*, v. 1, p. 20-30, 2001.
- Kuria, J.K., Mbutia, P.G., Kang'ethe, E.K., Wahome, R.G. Caseous Lymphadenitis in Goats: The Pathogenesis, Incubation Period and Serological Response after Experimental Infection. *Veterinary Research Communications*, v. 25, p. 89-97, 2001.
- Lenco, J., Hubalek, M., Larsson, P., Fucikova, A., Brychta, M., Macela, A., Stulik, J. Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island. *Proteins IgIABC. FEMS microbiology letters*, v. 269, p. 11-21, 2007.
- Lipsky, B. A., Goldberger, A. C., Tompkins, L. S. & Plorde, J. J. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Reviews of infectious diseases*, v. 4, p. 1220–1235, 1982.
- Litwin, C. M. & Calderwood, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p.137-49, 1993.
- Maurer, A.P., Mehlitz, A., Mollenkopf, H.J., Meyer, T.F. Gene expression. Profiles of *chlamydomphila pneumoniae* during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *Plos pathology*, v. 3, n.6, p. 752-769, 2007.
- Mcnamara, P.J., Cuevas, W.A., Songer, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning sequence homology. *Gene*, v. 156, p. 113– 118, 1995.
- Mohan, P., Vathsala, M., Jayaprakasan, V. Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. *Small Ruminant Research*, v. 74, p. 226-230, 2008.
- Moura-Costa, L.F., Paule, B.J.A., Azevedo, V., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Regis, L.F., Vale, V.L.C., Matos, D.P., Bahia R.C., Carminati, R., Meyer, R. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 3, p. 1-9, 2002.
- Muckle, C.A., Gyles, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.46, p. 206–208, 1982.
- MUCKLE, C.A. GYLES, C.L. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 1149-1153, 1983.

- Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., Komatsuzawa, H. Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 8097–8105, 2011.
- Paradkar, P.N., De Domenico, I., Durchfort, N., Zohn, I., Kaplan, J., Ward, D.M. Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. *Blood*, v. 112, p. 866-874, 2008.
- Paule, B.J., Azevedo, V., Regis, L.F., Carminati, R., Bahia, C.R., Vale, V.L., Moura-Costa, L.F., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Goes, A.M., Meyer, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 96, p. 129-139, 2003.
- Paule, B.J.A., Meyer, R., Moura-Costa, L.F., Bahia, R.C., Carminati, R., Regis, L.F., Vale, V.L.C., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Azevedo, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, v. 34, p. 311-316, 2004.
- Pekelder, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. *Diseases of Sheep*. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 270-274, 2000.
- Raman, K., Yeturu, K., Chandra, N. TargetTB: a target identification pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis. *BMC Systems Biology*, v. 2, p. 109, 2008.
- Rodriguez, G.M. & Smith, I. Identification of a ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n.2, p.424-430, 2006.
- Ruiz, J.C., D’Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., Pinto, A.C., Santos, Lopes, D.O., Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Costa, M.P., Turk, M.Z., Seyffert, N., Moraes, P.M., Soares, S.C., Almeida, S.S., Castro, T.L., Abreu, V.A., Trost, E., Baumbach, J., Tauch, A., Schneider, M.P., McCulloch, J., Cerdeira, L.T., Ramos, R.T., Zerlotini, A., Dunitini, A., Resende, D.M., Coser, E.M., Oliveira, L.M., Pedrosa, A.L., Vieira, C.U., Guimarães, C.T., Bartholomeu, D.C., Oliveira, D.M., Santos, F.R., Rabelo, É.M., Lobo, F.P., Franco, G.R., Costa, A.F., Castro, I.M., Dias, S.R., Ferro, J.A., Ortega, J.M., Paiva, L.V., Goulart, L.R., Almeida, J.F., Ferro, M.I., Carneiro, N.P., Falcão, P.R., Grynberg, P., Teixeira, S.M., Brommonschenkel, S., Oliveira, S.C., Meyer, R., Moore, R.J., Miyoshi, A., Oliveira, G.C., Azevedo, V. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*, v. 6, p.1-16, 2011.
- Sampaio, G.P. (2012). Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas / Geraldo Pedral Sampaio. – Salvador, 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia.

- Santos, A.R., Carneiro, A., Gala-Garcia, A., Pinto, A., Barh, D., Barbosa, E., Aburjaile, F., Dorella, F., Rocha, F., Guimarães, L., Zurita-Turk, M., Ramos, R., Almeida, S., Soares, S., Pereira, U., Abreu, V.C., Silva, A., Miyoshi, A., Azevedo, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* *in silico* predicted pan-exoproteome. BMC Genomics, v. 13, s. 5, p. 1-12, 2012.
- Santos, W. R., Paraguai De Souza, E., Palatnik, M., Palatnik De Sousa, C. B. Vaccination of Swiss Albino mice against experimental visceral leishmaniasis with the FML antigen of *Lishmania donovani*. Vaccine, v. 17, p. 2554-2561, 1999.
- Schmitt, M.P. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of gene whose product is homologous to Eukaryotic heme oxygenases and is required for aquisition off rom heme and hemoglobin. Journal of bacteriology, v. 179, n. 3, p. 838-845, 1997.
- Schneewind, O. & Missiakas, D.M. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, v. 19, p. 1123-1139, 2012.
- Smith, J. L. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. Critical Reviews in Microbiology, v. 30, p.173-185, 2004.
- Soares, A. T., Viana, J. A., Lemos, P. F. B. A. Recomendações Técnicas para Produção de Caprinos e Ovinos. Tecnologia & Ciência Agropecuária, v.1., n.2, p.45-51, 2007.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J., Von Mering, C. et al. Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Research, v. 43, p. 447-52, 2015.
- Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., Stoye, J., Dorella, F.A., Rocha, F.S., Soares Sde, C., D'Afonseca, V., Miyoshi, A., Ruiz, J., Silva, A., Azevedo, V., Burkovski, A., Guiso, N., Join-Lambert, O.F., Kayal, S., Tauch, A. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. BMC Genomics, v. 11, p. 1-17, 2010.
- Tsirigos, K.D., Peters, C., Shu, N., Kall, L., Elofsson, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. Nucleic Acids Research, v. 43, p. 401-07, 2015.
- Valledor, L. & Jorin, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. Journal of Proteomics, v. 74, p. 1-18, 2011.
- Von Mering, C., Jensen, L.J., Snel, B., Hooper, S.D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M.A., Bork, P. STRING: Known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. Nucleic Acids Research, v. 33, p. 4333-7, 2005.

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

[www.thegpm.org/tandem/](http://www.thegpm.org/tandem/). Accessed 20 Aug 2016.

[www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). Accessed 20 Aug 2016.

Yu, L., Luo, J., Guo, Y., Li, Y., Pu, X., Li, M. In silico identification of gram negative bacterial secreted proteins from primary sequence. *Computers in Biology and Medicine*, v. 43, p. 1177–81, 2013.



## 10. ANEXO

### Produções no período do Doutorado

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. CARDEAL, B. ; Sena, L. ; LOUREIRO, D. ; Sousa, T. J. ; **RAYNAL, JOSÉ T** ; BASTOS, B. L. ; MEYER, R. ; PORTELA, R. W. . Determinação de valores de referência séricos para os eletrólitos magnésio, cloretos, cálcio e fósforo em ovinos das raças Dorper e Santa Inês. Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso), v. 36, p. 167-173, 2016.
2. **RAYNAL, J. T.**; CARDEAL, B. ; ALVES, A ; BAHIENSE ; SILVA, H. C. ; MEYER, ROBERTO ; PORTELA, RICARDO W . Rhipicephalus (Boophilus) microplus resistance to acaricides. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 110, p. 23-29, 2015.
3. NASCIMENTO, A. B. ; NASCIMENTO, A. B. ; **RAYNAL, J. T.** ; OLIVEIRA, T. B. ; SALES, T. S. . Inquérito com produtores rurais de Ribeira do Pombal-BA a respeito do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 12, p. 82-82, 2014.

#### Resumos publicados em anais de congressos

1. LIMA, G. A. R. ; MACIEL, I. L. ; ALCANTARA, M. E. ; SA, M. C. A. ; **RAYNAL, J. T.** ; MEYER, R. . PRODUCTION AND PURIFICATION OF MOLECULES DERIVED FROM *Corynebacterium pseudotuberculosis* ISOLATED. In: XVI EXPOPPGIM, 2016, SALVADOR. Revista Ciências Médicas e Biológicas [Journal of Medical and Biological Sciences], 2016. v. 15. p. 280.
2. MACIEL, I. L. ; LIMA, G. A. R. ; ALCANTARA, M. E. ; SA, M. C. A. ; **RAYNAL, J. T.** ; BASTOS, B. L. ; MEYER, R. . CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS EXTRACTED MOLECULES WITH IMMUNOGENIC AND IMMUNODIAGNOSTIC POTENCIALS. In: XVI EXPOPPGIM, 2016, SALVADOR. Revista Ciências Médicas e Biológicas [Journal of Medical and Biological Sciences], 2016. v. 15. p. 283.
3. ALCANTARA, M. E. ; LIMA, G. A. R. ; MACIEL, I. L. ; SA, M. C. A. ; **RAYNAL, J. T.** ; BASTOS, B. L. ; MEYER, R. . EVALUATION BY MASS SPECTROMETRY (ESI-MS) OF MOLECULES EXPRESSED ON MEMBRANE OF CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS GROWN IN FETAL BOVINE SERUM. In: XVI EXPOPPGIM, 2016, SALVADOR. Revista Ciências Médicas e Biológicas [Journal of Medical and Biological Sciences], 2016. v. 15. p. 294.
4. OLIVEIRA, T. B. ; SANTOS, H. ; BRITO, I. ; **RAYNAL, J. T.** ; SA, M. C. A. ; NOBRE, E. K. ; MEYER, R. ; TRINDADE, S. . STUDY OF EXPRESSION OF FACTORS PROMOTERS RESUSCITATION AND IMMUNE RESPONSE IN SHEEP INFECTED CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS. In: XVI

EXPOPPGIM, 2016, SALVADOR. Revista Ciências Médicas e Biológicas [Journal of Medical and Biological Sciences], 2016. v. 15. p. 309.

5. ALVES, A ; **RAYNAL, JOSÉ T** ; BARRAL, T. A. ; PORTELA, RICARDO W ; BAHIENSE . *Amblyomma varium* (Koch, 1844) and *Amblyomma calcaratum* (Neumann, 1889) in a sloth (*Bradypus variegatus*) from the Atlantic Rainforest in Bahia State. In: 5 th International Symposium of Entomology, 2015, Viçosa. Proceedings of the 5 th International Symposium of Entomology, 2015.

### **Apresentações de Trabalho**

1. RAMOS, J. S. ; **RAYNAL, J. T.** ; MAGGITT JUNIOR, L. P. ; AYRES, M. C. C. ; GUSMAO, A. L. ; BASTOS, B. L. ; GUIMARAES, J. E. ; SOUZA, W. R. . ESTUDO DA CINÉTICA DA HAPTOGLOBINA EM OVINOS DA RAÇA DORPER DO NASCIMENTO AOS SEIS MESES DE VIDA. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

### **Artigos submetidos**

#### **1. Microbiology and Molecular Biology Reviews**

Immune Response Against *Haemonchus contortus* and the Th1-Th2 paradigm in Helminth Infection

#### **2. Microbiology and Immunology.**

Cell wall glycolipids from *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains with different virulences differ in terms of composition and immune recognition

#### **3. Small Ruminant Research**

Serum haptoglobin and ceruloplasmin reference intervals for Dorper lambs

## Dados da curva Roc

Área sob a curva

Variável(eis) de resultado de teste	Área	Erro Padrão <sup>a</sup>	Sig. assintótico <sup>b</sup>	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
				Limite inferior	Limite superior
Sec_VD57	,851	,055	,000	,742	,960
Memb_VD57	,860	,056	,000	,749	,971

A variável ou variáveis de resultado de teste: Sec\_T1 possuem pelo menos um vínculo entre o grupo de estado real positivo e o grupo de estado real negativo. As estatísticas podem ser enviesadas.

a. Sob a suposição não paramétrica

b. Hipótese nula: área real = 0,5

Coordenadas da curva

Variável(eis) de resultado de teste	Positivo se maior ou igual a	Sensibilidade	1 - Especificidade
Sec_VD57	-,95650	1,000	1,000
	,05150	1,000	,933
	,06400	1,000	,867
	,06875	1,000	,800
	,07250	1,000	,733
	,07800	,967	,733
	,08825	,967	,667
	,09800	,967	,600
	,10200	,967	,533
	,10600	,933	,533
	,10975	,900	,533
	,11950	,867	,533
	,12900	,867	,467
	,13200	,833	,467
	,13625	,833	,400
	,14125	,800	,400
	,14475	,800	,333
	,15125	,767	,333
	,15675	,767	,267
	,16325	,733	,267
,16925	,700	,267	
,20325	,700	,200	
,23800	,700	,133	
,24150	,667	,133	
,24850	,633	,133	
,25850	,633	,067	
,27550	,600	,067	

## Coordenadas da curva

Variável(eis) de resultado de teste	Positivo se maior ou igual a	Sensibilidade	1 - Especificidade
	,20575	,400	,200
	,20650	,400	,133
	,20725	,400	,067
	,22350	,367	,067
	,27875	,333	,067
	,32025	,300	,067
	,33650	,267	,067
	,35650	,267	,000
	,36425	,233	,000
	,41075	,200	,000
	,45800	,167	,000
	,50500	,133	,000
	,69900	,100	,000
	,88175	,067	,000
	,95900	,033	,000
	2,00300	,000	,000
Sec_VD57	-,95650	1,000	1,000
	,05150	1,000	,933
	,06400	1,000	,867
	,06875	1,000	,800
	,07250	1,000	,733
	,07800	,967	,733
	,08825	,967	,667
	,09800	,967	,600
	,10200	,967	,533
	,10600	,933	,533
	,10975	,900	,533
	,11950	,867	,533
	,12900	,867	,467
	,13200	,833	,467
	,13625	,833	,400
	,14125	,800	,400
	,14475	,800	,333
	,15125	,767	,333
	,15675	,767	,267
	,16325	,733	,267
	,16925	,700	,267
	,20325	,700	,200
	,23800	,700	,133
	,24150	,667	,133
	,24850	,633	,133
	,25850	,633	,067
	,27550	,600	,067

**Coordenadas da curva**

Variável(eis) de resultado de teste	Positivo se maior ou igual a <sup>a</sup>	Sensibilidade	1 - Especificidade
	,54900	,667	,000
	,58525	,633	,000
	,62025	,600	,000
	,66300	,567	,000
	,71775	,533	,000
	,74175	,500	,000
	,77250	,467	,000
	,82225	,433	,000
	,84275	,400	,000
	,86725	,367	,000
	,91650	,333	,000
	,98425	,300	,000
	1,06375	,267	,000
	1,12475	,233	,000
	1,18675	,200	,000
	1,22800	,167	,000
	1,24225	,133	,000
	1,29150	,100	,000
	1,34100	,067	,000
	1,52475	,033	,000
	2,69700	,000	,000

A variável ou variáveis de resultado de teste: Sec\_T1 possuem pelo menos um vínculo entre o grupo de estado real positivo e o grupo de estado real negativo.

- a. O menor valor de corte é o valor mínimo de teste observado menos 1, e o maior valor de corte é o valor máximo de teste observado mais 1. Todos os outros valores de corte são as médias de dois valores de teste observados ordenados consecutivos.