

**A IMPORTÂNCIA DO FERRO NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE  
*CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* COM POTENCIAIS  
ANTIGÊNICOS E SEUS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA**

José Tadeu Raynal Rocha Filho  
Pesquisador do LABIMUNO (Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular) /UFBA  
E-mail: [jtraynal@hotmail.com](mailto:jtraynal@hotmail.com)

Maria Conceição Aquino de Sá  
Departamento de Biointeração - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular -ICS  
– UFBA  
E-mail: [ceicazoo@hotmail.com](mailto:ceicazoo@hotmail.com)

Igor Farias Tavares  
Departamento de Biointeração - Laboratório de Imunologia e Biologia  
Molecular - ICS – UFBA  
E-mail: [igorbio@hotmail.com](mailto:igorbio@hotmail.com)

Rafael Araujo Gomes Júnior  
UNIME

Edvana dos Santos Ferreira  
UNIME

**RESUMO**

O *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp) é o agente causador da linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos, enfermidade associada a perdas econômicas diretas no setor pecuário. Apesar dos esforços, a erradicação da linfadenite caseosa é desafiadora devido à sua disseminação e à ineficácia das vacinas existentes. A compreensão dos mecanismos de virulência do Cp é crucial para o desenvolvimento de estratégias de controle. A captação de ferro é vital para a sobrevivência bacteriana, contudo em condições de restrição muita conseguem sobreviver e se multiplicar em condições de restrição utilizando outros minerais para desempenhar a suas funções metabólicas. Estudos indicam que o Cp desenvolveu mecanismos sofisticados para adquirir ferro do ambiente hospedeiro. A disponibilidade de ferro é reduzida durante infecções, levando as bactérias a desenvolverem estratégias de captação desse metal. Dessa forma, a compreensão desses mecanismos pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

**Palavras-chave:** *C. pseudotuberculosis*, ferro e fatores de virulência.

## INTRODUÇÃO

O *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp) é o agente causador da linfadenite caseosa (LC), uma enfermidade infecciosa que causa consideráveis prejuízos à indústria ovinocaprina. Essa doença crônica não só impacta a saúde dos animais, mas também afeta negativamente o ganho de peso, a produção de leite e a qualidade do couro, resultando em perdas econômicas significativas para os criadores (Dorella *et al.*; 2006). O tratamento com antibióticos é impraticável, e a erradicação da doença é um desafio devido à sua disseminação generalizada nos rebanhos e à falta de uma vacina eficaz (Bastos *et al.*; 2012).

A complexidade da LC e a inadequação das vacinas existentes ressaltam a importância de compreender os mecanismos moleculares de virulência do Cp. Estudos indicam que a capacidade de persistência e patogenicidade deste patógeno está estreitamente relacionada à sua habilidade de adquirir ferro do ambiente hospedeiro (Dorella *et al.*; 2006; Paule *et al.*; 2003). O ferro desempenha um papel crucial no estabelecimento de infecções bacterianas, sendo essencial para o crescimento e sobrevivência de muitos microrganismos. Em ambientes de infecção, a disponibilidade de ferro é naturalmente reduzida como uma estratégia de defesa do hospedeiro, levando as bactérias patogênicas a desenvolverem mecanismos sofisticados de captação deste metal (Andrews *et al.*; 2003; Cordelis & Andrews, 2010).

Diante deste cenário, a compreensão dos mecanismos de virulência do Cp e a identificação de moléculas associadas à patogênese são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da LC.

### **CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS**

O patógeno causador da enfermidade infecciosa linfadenite caseosa (LC), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp), é o 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 *Cp*.

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 (Binnset *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; Mohanet *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.

### **PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DO CP**

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 (Dorellaet *al.*; 2006; Baird & Fontaine, 2007). Após a entrada, ocorre a formação lesões granulomatosas (Kuriaeet *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 superfícies 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).

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 compõe 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 (Heinrich *et al.*; 1999; Brown *et al.*; 2001, a-b).

### **IMPORTÂNCIA 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; Cordelis&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 de 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; Paradkaret *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 (Oogaiet *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; Cordelis&Andrews, 2010; Hood &Skaar, 2012; Ganz &Nemeth, 2015).

Bactérias captam ferro de diferentes formas, sendo 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), enzimas multimodulares que se assemelham às ácido graxo sintases de tipo I de eucariotos (Chan & Vogel, 2010). Essa via de síntese de sideróforos 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 álcoois, derivados de aminoácidos. Genses com alta similaridade a *ciuA* ou *ciuB*, que são proteínas associadas ao transporte de ferro e estão presentes em bactérias que possuem algum tipo de sideróforo (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; Cordelis & 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). A 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; Jackson *et al.*; 2010).

## 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 esfingomiéline 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.*; 1999; 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), 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&Jorrin, 2011), avaliando suas variações moleculares dentro de uma população, quantidades, mudanças em resposta ao ambiente e suas interações.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

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.

## REFERÊNCIAS

- AHRENS, Christian H.;BRUNNER, Erich;QELI, Ermir; Basler, Konrad;AEBERSOLD, Ruedi. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, p. 789-801, 2010.
- ALVES, Francisco S.F.; Pinheiro, Raymundo R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. Sociedade Nacional de Agricultura, [S.l.], ano 100, 1997.
- ANDREWS, Simon C.;ROBINSON, Andrea K.;RODRIGUEZ-QUINONES, Francisco.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 ofComparative 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.
- BARRY, S. M.; CHALLIS, G. L. Recentadvances in siderophorebiosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 13, v.205-215, 2009.



- 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.
- 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.
- 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.
- 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 PIERRE; ANDREWS SIMION C. Iron uptake and homeostasis in microorganisms. Caister Academic Press. 2010.
- CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Caister Academic Press. v. 86, p. 1637-1645, 2010.
- 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.
- 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, 2006.
- GANZ, T. & NEMETH, E. Iron homeostasis in host defense and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, p. 500-510, 2015.
- HANDMAN, E. Leishmania vaccines: Old and new. *Parasitology Today*, v. 13, p. 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.
- HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, p.525-537, 2012.
- 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.
- KURIA, J.K.; MBUTHIA, 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.

Lipsky, B. A.; Goldberger, A. C.; Tompkins, L. S. & Plorde, J. J. Infections caused by non-diphtheria 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 *Chlamydia 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.

Muckle, C.A.; Gyles, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.46, p. 206–208, 1982.

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.; SCHAEER, 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.; SCHAEER, 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.

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, PM.; 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.; DOMINITINI, 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.

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 *Lishmaniadonovani*. *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 acquisition of iron from 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.

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.; GUIZO, 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.

VALLEDOR, L.; JORRIN, 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.

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