



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROTEÍNAS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*
ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO:
CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E POTENCIAL EMPREGO NO
TRATAMENTO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR ESSA BACTÉRIA**

por

CINTIA SENA CARVALHO

**TCC apresentado ao Instituto de Biologia
da Universidade Federal Bahia como exigência para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas**

Salvador, BA
2020

Data da Defesa: 3 de dezembro de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Luiz de Paula Castro
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Wanderson Marques da Silva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Ms. Rodrigo Profeta Silveira Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno Gram-positivo, anaeróbio facultativo, agente etiológico de diversas doenças em caprinos, ovinos, equinos, bovinos, dentre outros animais. A linfadenite caseosa (LC) é uma das principais doenças causadas por essa bactéria. Esta enfermidade causa abscessos nos gânglios linfáticos superficiais e órgãos internos, comprometendo a saúde e a produtividade de pequenos ruminantes. *C. pseudotuberculosis* pode resistir a diferentes estresses ambientais, como por exemplo, o estresse oxidativo presente nas células fagocíticas do hospedeiro. As bactérias são capazes de modular a expressão gênica para sobreviver e superar a toxicidade causada pelas espécies reativas de oxigênio. Com base nisto, o estudo da proteômica bacteriana tem sido importante pela utilização de metodologias que permitem a caracterização de proteínas que são produzidas por microrganismos em diferentes tipos de estresse e/ou ao longo do curso de uma doença. Neste estudo, proteínas de *C. pseudotuberculosis* diferencialmente abundante sob estresse oxidativo *in vitro* foram caracterizadas através de dados obtidos por busca manual em operadores *booleanos* e ferramentas bioinformáticas. A localização subcelular e as interações proteína-proteína foram preditas utilizando as ferramentas SurfG+ e STRING. Além disso, foi realizada uma triagem das proteínas que foram as mais abundantes durante a condição de estresse para a predição de alvos para drogas. A análise da ligação dessas proteínas com compostos naturais foi realizada por meio de *docking* molecular utilizando os softwares AutoDock Vina e Chimera. Os resultados *in silico* confirmaram que as proteínas não possuem sequências relacionadas aos mecanismos clássicos de secreção celular e podem estar envolvidas na resposta ao estresse oxidativo de forma direta ou indireta. Dentre as proteínas mais abundantes na condição avaliada, Tal e Mdh, por exemplo, são relatadas na literatura por apresentarem envolvimento direto com a resposta bacteriana ao estresse. Já as chaperonas moleculares como Tig e GroEL podem atuar em conjunto, prevenindo o enovelamento incorreto de proteínas durante a oxidação. As proteínas envolvidas em vias biossintéticas, por sua vez, colaboram para a homeostase celular. Várias dessas proteínas são codificadas por genes coexpressos e/ou vizinhos. Observamos que duas das proteínas mais abundantes na condição de estresse, Ddl e Ppa, são potenciais alvos para drogas e apresentaram elevada afinidade com os compostos ZINC04235924 e ZINC015709489, respectivamente. Além disso, o composto ZINC04235924 apresentou afinidade com ambas as proteínas. Esses resultados são pertinentes não somente para a compreensão da resistência bacteriana na condição de estresse oxidativo, mas também para o *design* de novas drogas para o tratamento de doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-chave: Corinebactéria, adaptação ao estresse, proteômica, alvos para drogas.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive, facultative anaerobic pathogen. This bacterium is the etiologic agent of many diseases in goats, sheep, horses, cattle, among other animals. Caseous lymphadenitis (CLA) is one of the main diseases caused by this bacterium. It causes abscesses in the superficial lymph nodes and internal organs, compromising the health and productivity of small ruminants. *C. pseudotuberculosis* can resist different environmental stresses, such as the oxidative stress present within the host phagocytic cells. Bacteria modulate gene expression to survive and overcome the toxicity of reactive oxygen species. Based on this, bacterial proteomics has been important due to the use of methodologies that allow the characterization of proteins that are expressed by microorganisms in different stress conditions and/or throughout the course of a disease. In this study, proteins differentially abundant by *C. pseudotuberculosis* under oxidative stress in vitro were characterized through data obtained by manual search in Boolean operators and bioinformatics tools. Subcellular localization and protein-protein interactions were predicted using the SurfG + and STRING tools. Besides, a screening of proteins that were mostly produced during stress condition was performed aiming to predict drug targets. The binding analysis of these proteins with possible natural compounds was performed by molecular docking using the AutoDock Vina and Chimera software. The in silico results confirmed that proteins produced do not have sequences related to the classic mechanisms of cell secretion and may be involved in oxidative stress response directly or indirectly. Among the upregulated proteins in the evaluated condition, Tal and Mdh, for example, are reported in the literature to be directly involved with the bacterial stress response. Molecular chaperones such as Tig and GroEL can act together, preventing incorrect protein folding during oxidation. Proteins involved in biosynthetic pathways, in turn, contribute to cell homeostasis. Several of these proteins are encoded by co-expressed genes and/or by gene neighbors. We observed that two upregulated proteins, Ddl and Ppa, are potential drug targets and showed a high affinity with the compounds ZINC04235924 and ZINC015709489, respectively. ZINC04235924 showed affinity with both proteins. These results are relevant not only for understanding bacterial resistance in oxidative stress condition but also for the design of new drugs in the treatment of diseases caused by *C. pseudotuberculosis*.

Keywords: Corinebacteria, stress adaptation, proteomics, drug targets.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui.

A Universidade Federal da Bahia e ao laboratório de imunologia e biologia molecular pelo suporte técnico e por possibilitar a execução deste trabalho.

Ao Instituto de Biologia, em especial ao corpo docente, pelos anos de conhecimento proporcionados.

A Universidade Federal de Minas Gerais pelo espaço físico e equipamentos utilizados na primeira etapa deste trabalho.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Ao Prof. Dr. Thiago Luiz de Paula Castro por sua orientação e confiança.

A Prof. Dr. Núbia Seyffert por todo apoio, paciência e confiança que foram fundamentais.

A Igor Batista dos Santos Oliveira pela inestimável ajuda nas análises de docking molecular.

A minha mãe, Eneida Sena, pelo enorme entusiasmo, palavras de apoio e encorajamento.

A toda minha família pelo constante incentivo.

A todos os amigos, colegas e colaboradores do grupo de pesquisa por todas as discussões que de certa forma contribuíram para a construção desse trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1 - Rede de interações entre os genes codificantes das proteínas de *C. pseudotuberculosis* 1002.....18

Figura 2 - Representação tridimensional da análise do docking molecular para sítios ativos da D-alanina-D-alanina ligase (Ddl) com o composto ZINC04235924.....21

Figura 3 - Representação tridimensional da análise do docking molecular para sítios ativos da Pirofosfatase inorgânica (Ppa) com o composto ZINC015709489.....21

Figura 4 - Representação bidimensional da estrutura dos compostos.....21

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1 - Proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i> diferencialmente abundantes identificadas por MALDI-TOF.....	16
Tabela 2 - Homologia com o proteoma dos hospedeiros e análise de essencialidade dos 12 genes regulados positivamente na análise proteômica.....	19
Tabela 3 - Afinidade de ligação predita por AutoDock Vina e ligações de hidrogênio do melhor ligante para cada proteína alvo e do ligante ZINC0435924 com a proteína WP_013242650.1.....	20

ÍNDICE DAS ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ARG30	Arginina 30
ARG118	Arginina 118
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CMNR	<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
Cy	Cyanine dyes
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GDP	<i>Guanosine Diphosphate</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN- γ	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina G 1
IgG2	Imunoglobulina G 2
kDa	Kilodalton
LC	Linfadenite Caseosa
LYS126	Lisina 126
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
PBIT	<i>Pipeline Builder for Identification of drug Targets</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pv	Patovar
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SER24	Serina 24
SER25	Serina 25
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
tRNA	<i>Transfer Ribonucleic Acid</i>
TYR42	Tirosina 42
UniProt	<i>Universal Protein</i>
°C	Grau(s) Celsius
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE.....(i)

ÍNDICE DAS FIGURAS.....(ii)

ÍNDICE DAS TABELAS.....(iii)

ÍNDICE DAS ABREVIATURAS E SIGLAS.....(iv)

1. INTRODUÇÃO.....1

2. REVISÃO DA LITERATURA.....4

2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*.....4

2.2 Doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*.....5

2.3 Métodos diagnósticos e tratamentos e profilaxia para o controle de *C. pseudotuberculosis*.....7

2.4 Patogênese e respostas a estresses ambientais.....9

3. OBJETIVOS.....12

3.1 Objetivo geral.....12

3.2 Objetivos específicos.....12

4. METODOLOGIA.....13

4.1 Ensaio de estresse oxidativo, extração e separação de proteínas.....13

4.2 Identificação das proteínas por espectrometria de massas.....13

4.3 Busca manual das proteínas identificadas e predição de localização subcelular.....14

4.4 Análise das interações proteína-proteína.....14

4.5 Predição de alvos para drogas.....15

5. RESULTADOS.....16

5.1 Proteínas identificadas: função e localização.....16

5.2 Interações proteína-proteína.....17

5.3 Proteínas alvos para drogas e docking molecular.....18

6. DISCUSSÃO.....22

7. CONCLUSÕES.....27

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....28

APÊNDICE

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva e intracelular facultativa que apresenta-se como bacilos imóveis, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (COSTA, 2002). De acordo com testes bioquímicos as linhagens desta bactéria variam em relação a aptidão de fermentação e redução de nitrato (SUTHERLAND, HART e BULLER, 1996) e, segundo esta última, pode-se distinguir dois biovares, o Equi e o Ovis (BARAKAT *et al.*, 1984). Este microrganismo é agente etiológico de diferentes doenças, podendo infectar lhamas, alpacas, camelos, bovinos, equinos, caprinos, ovinos, dentre outros (FONTAINE e BAIRD, 2008). A infecção em humanos não é comum, mas há alguns casos reportados na literatura (BASTOS *et al.*, 2012), o que mostra o potencial zoonótico desta bactéria. Os biovares são encontrados em diferentes hospedeiros, sendo o biovar Ovis relatado por ocorrer em cabras, ovelhas (DORELLA *et al.*, 2006) e, embora menos frequente, vacas (YERUHAM *et al.* 1997).

Dentre as doenças causadas por esse patógeno estão a linfadenite caseosa (LC) e a linfangite ulcerativa (LU). Conhecida também como “mal do caroço”, a LC é uma doença infectocontagiosa caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos e órgãos internos, o que causa significativas perdas econômicas para os rebanhos de caprinos e ovinos (DORELLA *et al.*, 2006). Já a LU ocorre principalmente em equinos e bovinos e caracteriza-se por abscessos nos órgãos internos e infecção de vasos linfáticos subcutâneos nos membros posteriores (SPIER, 2008; LEITE *et al.*, 2019

C. pseudotuberculosis pertence ao grupo CMNR que inclui bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Os organismos que compõem este grupo apresentam semelhanças relacionadas à organização da parede celular, que é formada por peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Esses ácidos micólicos (JOLLY, 1966; HARD, 1975) juntamente com a exotoxina fosfolipase D (MCKEAN, DAVIES e MOORE, 2007) e o sistema de captação de ferro (BILLINGTON *et al.*, 2002) são reportados como importantes fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*. Além desses, a serina protease CP40, neuraminidase H, superóxido dismutase C, adesina SpaC e proteína quinase G são outros fatores importantes para a virulência deste patógeno (CORRÊA *et al.*, 2018).

Além dos genes que codificam para os fatores de virulência, genes associados podem contribuir para a sobrevivência bacteriana no ambiente ou no hospedeiro (KAZMIERCZAK, WIEDMANN e BOOR, 2005). Durante o processo patogênico, *C. pseudotuberculosis* é capturada por células fagocíticas e pode sobreviver dentro de macrófagos por mais de 48 horas (STEFANSKA, *et al.*, 2010). Ao longo de uma infecção, as bactérias precisam lidar com diversos estresses gerados pelo hospedeiro, inclusive o estresse oxidativo das células fagocíticas (SLAUCH, 2011). Além disso, é possível que em tecidos inflamados, como nos abscessos, haja uma maior concentração de H₂O₂ (IMLAY, 2018).

O estresse oxidativo gera espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam DNA, RNA, proteínas e lipídeos (CABISCOL, TAMARIT e ROS, 2000). Em casos como este os patógenos bacterianos são capazes de alterar a expressão gênica, ativando genes cujos produtos auxiliam na sobrevivência (CHOWDHURY *et al.*, 1996). Bactérias tolerantes ao oxigênio apresentam sistemas de reparo que sustentam a atividade de enzimas sensíveis a oxidação frente a EROs endógenos (IMLAY, 2018).

Produtos gênicos, como os gerados em condições de estresse, podem ser estudados através de ferramentas da proteômica, que é constituída por análises de identificação, quantificação, determinação da localização subcelular, modificação e outros aspectos protéicos (FIELDS, 2001). A proteômica abrange várias disciplinas e métodos como: imagem celular por microscopia de luz e eletrônica, análise *de novo* de proteínas ou conjunto de proteínas isoladas a partir de células ou tecidos, além das espectrometrias de massas (AEBERSOLD e MANN, 2003). Este último é o principal método para análise de produção e função de proteínas principalmente por causa de sua capacidade de adquirir informações quantitativas sobre amostras biológicas de enorme complexidade (CRAVATT, SIMON e YATES III, 2007). Em relação a *C. pseudotuberculosis*, vários estudos proteômicos já foram realizados objetivando caracterizar o genoma funcional sob estresse nitrosativo (SILVA, W *et al.*, 2014), identificar proteínas que contribuem para a virulência (SILVA, W *et al.*, 2017), predizer alvos para drogas (RADUSKY *et al.*, 2015) entre outros.

Nesse contexto, a bioinformática tem sido cada vez mais importante por fornecer ferramentas para análise dos dados gerados (BLUEGGEL, CHAMRAD e MEYER, 2004). Bancos de dados como o *search tool for the retrieval of interacting genes/proteins* (STRING), por exemplo, são fundamentais para o estudo da função e interação de proteínas. Essa plataforma avalia a interação protéica funcional a partir da combinação de informações oriundas de diversos bancos de dados (SZKLARCZYK *et al.*, 2015). No entanto, para além de interações proteína-proteína a bioinformática pode auxiliar em várias outras análises. A investigação de interações proteína-ligante mediante *docking molecular*, por exemplo, tem obtido cada vez mais destaque pois possibilita a predição de compostos candidatos a drogas contra alvos proteicos (CHAUDHARY e MISHRA, 2016), o que é fundamental para a elaboração de fármacos.

Neste trabalho as proteínas de *C. pseudotuberculosis* 1002 diferencialmente abundantes durante estresse oxidativo, obtidas num ensaio prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram avaliadas *in silico* quanto a suas funções, interações, localização subcelular e potencial como alvos para drogas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis foi primeiramente isolada de nódulos bovinos em 1888 por Nocard e completamente descrita por Preisz em 1894 (DORELLA *et al.*, 2006). Bacilo de Preisz-Nocard, *Bacillus pseudotuberculosis*, *Bacillus pseudotuberculosis ovis* e *Corynebacterium ovis* são sinônimos que foram utilizados para nomear esta bactéria, sendo a nomenclatura atual adotada na 6ª edição do Bergey's Manual em 1948 (DORELLA *et al.*, 2006; ALVES, SANTIAGO e PINHEIRO, 2007).

C. pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva e intracelular facultativa (DORELLA *et al.*, 2006) que apresenta-se como bacilos curtos e irregulares (0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm) podendo estar isolados ou em paliçada. São imóveis, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (COSTA, 2002). Apresenta crescimento ótimo a 37 °C, pH 7 a 7,2, e em meio *brain heart infusion* (BHI) e ágar sangue. O acréscimo de extrato de levedura, triptona ou lactoalbumina pode ser uma alternativa para enriquecimento do meio de cultivo (CAMERON e SWART, 1965; COSTA, 2002). Alguns autores relatam um melhor crescimento deste patógeno em atmosfera de 5% de CO₂ (MUCKLE e GYLES, 1982). Em meio sólido as colônias apresentam coloração pálida a amarelada, seca e de consistência friável, já em caldo há uma tendência na formação de aglomerados (BAIRD e FONTAINE, 2007). A parede celular de *C. pseudotuberculosis* é composta por peptidoglicano majoritariamente constituído de ácido meso-diaminopimérico (HOU *et al.*, 1997) pelos açúcares arabinose, manose e glucose (PUECH *et al.*, 2001) e ácidos micólicos de cadeia curta (COLLINS, GOODFELLOW e MINNIKIN, 1982). Em virtude das semelhanças na organização da parede celular, formada por peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, e ao alto conteúdo G+C no DNA, bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* formam o grupo CMNR (LIEBL, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Bioquimicamente as linhagens de *C. pseudotuberculosis* podem variar em relação a habilidade de fermentação e redução de nitrato (SUTHERLAND, HART e BULLER, 1996). Em geral, todas as linhagens produzem ácido a partir de diversas fontes de carbono como

frutose, glicose, maltose e manose, sem produzirem gás (SANTANA, 2014). A redução de nitrato pode ser utilizada para diferenciar o biovar *Equi*, que reduz nitrato, do biovar *Ovis*, que não reduz nitrato (MUCKLE e GYLES, 1982; BARAKAT *et al.*, 1984; COSTA, SPIER e HIRSH 1998). Essa distinção entre os biovares é confirmada geneticamente (SOARES *et al.*, 2013), mas não é suficiente para classificação como subespécies (DORELLA *et al.*, 2006). Ambos os biovares *Equi* e *Ovis* podem causar diferentes doenças em diversos hospedeiros.

2.2 Doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis pode infectar diversos animais como cavalos (POONACHA e DONAHUE, 1995), bovinos (PURCHASE, 1944; KARIUKI e POULTON, 1982), lhamas e alpacas (BRAGA, CHAVERA e GONZALEZ, 2006; BRAGA *et al.*, 2007), búfalos (MOHAMED e REDA, 2015), camelos (HAWARI, 2008), alces (KELLY, ROOD e SKIRPSTUNAS, 2012), ovelhas, caprinos e ovinos (PATON *et al.*, 1994; ÇETINKAYA *et al.*, 2002; CHIRINO-ZÁRRAGA, SCARAMELLI e REY-VALEIRÓN, 2006). A infecção em humanos não é comum. O primeiro caso relatado ocorreu em 1966 em um cortador de grama, no Panamá, que apresentou um quadro de linfadenopatia inguinal (LOPEZ *et al.*, 1966). Atualmente existem 34 casos relatados na literatura, o que mostra o potencial zoonótico desta bactéria. Dentre os infectados, a maioria eram homens que estavam constantemente expostos aos animais em fazendas (BASTOS *et al.*, 2012). Porém, existem casos relacionados a contaminação em laboratórios, como o de uma estudante de medicina veterinária que apresentou pneumonia causada por *C. pseudotuberculosis* (Heggelund *et al.*, 2015). A jovem apresentou sintomas leves nas vias aéreas com sensação de globus, tosse com expectoração purulenta e linfonodos aumentados no hilo direito e mediastino.

Embora diferentes animais possam ser infectados por *C. pseudotuberculosis*, os biovares *Equi* e *Ovis* são relatados por causarem doenças diferentes. O biovar *Equi* causa a febre do pombo, a linfangite ulcerativa, a mastite e a doença de pele edematosa em equinos, bovinos e bubalinos, respectivamente (SELIM, 2001; SILVA, A *et al.*, 2011; GUEDES *et al.*, 2015; STEEFORTH e MARUTSOV, 2017). Em equinos a infecção causada por essa bactéria apresenta diversas formas, sendo a mais comum a caracterizada pela formação de abscessos no peitoral ou abdômen ventral e conhecida como febre do pombo.

As outras duas formas clínicas incluem a formação de abscessos nos órgãos internos, e a infecção de vasos linfáticos subcutâneos e tecidos adjacentes nos membros posteriores, chamada de linfangite ulcerativa (SPIER, 2008; LEITE *et al.*, 2019). Esta última também é observada em bovinos (STEERFORTH e MARUTSOV, 2017). Apesar dos equinos e bovinos normalmente serem infectados por linhagens do biovar Equi, algumas linhagens nitrato-negativas foram isoladas de cavalos e vacas (CONNOR *et al.* 2000; YERUHAM *et al.* 1997). No entanto, de modo geral o biovar *Ovis* causa a linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes (WILLIAMSON, 2001).

A LC é uma doença infectocontagiosa que afeta tanto a caprinocultura quanto a ovinocultura (HOLANDA FILHO *et al.*, 2019). Também chamada de “mal do carço”, esta doença caracteriza-se pela formação de abscessos nos linfonodos e órgãos internos, causando significativas perdas econômicas para os criadores (DORELLA *et al.*, 2006). A transmissão pode se dar de forma direta, através do contato com o material purulento liberado de abscessos e por transmissão aérea entre os animais devido a lesões pulmonares (NAIRN e ROBERTSON, 1974; ELLIS, *et al.*, 1987; WINDSOR, 2011) e de forma indireta, por meio da ingestão de alimentos e água contaminada e pelo uso de ferramentas utilizadas na castração, identificação com brincos e tosquia (WILLIAMSON, 2001; WINDSOR, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2011). Outros fatores como pregos salientes, arames farpados, lascas de madeira e, em alguns casos, a vegetação espinhosa dos ambientes de criação aumentam o risco de contaminação (UNANIAN, SILVA e PANT, 1985; WILLIAMSON, 2001), uma vez que podem machucar os animais e abrir portas de entrada para o patógeno. Além disso, *C. pseudotuberculosis* pode sobreviver no ambiente por semanas, ou até meses, o que aumenta o risco de infecção (BAIRD e FONTAINE, 2007).

A LC está distribuída em todo o mundo, embora em algumas regiões a prevalência da doença possa ser subnotificada. Na Austrália, um dos principais países produtores de carne e lã, essa doença é a principal causa da perda de carcaças de ovinos (PATON *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2011). No Brasil a soroprevalência da LC foi avaliada em alguns estados. No estado de Minas Gerais 78,9% dos caprinos avaliados testaram positivo e 98% dos rebanhos apresentaram ao menos um animal soropositivo (SEYFFERT *et al.*, 2010). Já no Distrito Federal, 44,0% de ovinos foram soropositivos (CARMO *et al.*, 2012). No estado de Goiás, por sua vez, 32,2% dos ovinos e 54,7% dos caprinos avaliados estavam

infectados (BARBOSA, 2016). No Nordeste, Alves *et al.* (2020) determinaram a soropositividade da LC em ovinos de cinco estados, todos eles apresentaram soroprevalência elevada. Esta doença está entre as enfermidades que impactam a caprinocultura e ovinocultura no Nordeste brasileiro (FACCIOLI-MARTINS, ALVES e PINHEIRO, 2014). Nesta região, a caprinocultura apresenta importante papel socioeconômico por suprir populações de baixa renda de proteína de valor biológico (VIEIRA *et al.*, 2016). Além disso, o ambiente característico da localidade contribui para o surgimento de animais adaptados a sobreviver em condições precárias e em períodos de seca (VIEIRA *et al.*, 2016). Em 2018 a região Nordeste foi responsável por 93,9% e 66,7% dos rebanhos de caprinos e ovinos estimados para o Brasil, respectivamente. A Bahia deteve 30,2% do rebanho de caprinos e 22,1% do rebanho de ovinos do país, liderando o *ranking* nacional para ambas as criações (IBGE, 2018). Desse modo, considerando a importância da caprinocultura e da ovinocultura para o Nordeste brasileiro e para o Estado da Bahia, a busca por métodos de diagnóstico e tratamento da LC se faz cada vez mais necessárias.

2.3 Métodos diagnósticos, tratamentos e profilaxia para o controle de *C.*

pseudotuberculosis

De modo geral, o diagnóstico da LC é feito segundo a observação de sintomas clínicos e da identificação de *C. pseudotuberculosis* coletada dos abscessos caseosos (BASTOS *et al.*, 2012). O isolamento da bactéria por cultivo em meio BHI ágar e a identificação mediante testes bioquímicos são métodos tradicionais e considerados padrão-ouro de diagnóstico das doenças causadas por *C. pseudotuberculosis* (RIBEIRO *et al.*, 2001). Os testes bioquímicos podem ser realizados através do sistema API Coryne, comercializado pela BioMérieux (France). No entanto, testes sorológicos e moleculares podem ser mais eficazes, uma vez que animais infectados podem não apresentar sinais clínicos observáveis (SHIGIDI, 1978). Dentre eles estão a hemaglutinação indireta (SHIGIDI, 1979), a imunodifusão (BURRELL, 1980), o teste de inibição da hemólise sinérgica (BROWN, OLANDER e ALVES, 1987) e testes imunoenzimáticos como o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (KABA, KUTSCHKE e GERLACH, 2001; SEYFFERT *et al.*, 2010; FARIAS *et al.*, 2018). Dentre os testes de ELISA estão os que utilizam antígenos da parede celular (SUTHERLAND *et al.*, 1987), antígenos secretados (SEYFFERT *et al.*,

2010) exotoxinas (MENZIES *et al.*, 1994). Além disso, um ELISA baseado na detecção de interferon gama (IFN- γ) como marcador anti-*C. pseudotuberculosis* também tem sido utilizado (PRESCOTT, MENZIES e HWANG, 2002). De acordo com Menzies, Hwang e Prescott (2004) os IFN- γ -ELISA são eficientes na detecção da doença em caprinos.

Testes moleculares de *polymerase chain reaction* (PCR) também têm se mostrado eficientes. Pacheco *et al.* (2007) demonstraram que o multiplex PCR (mPCR) foi eficiente para a detecção de 40 isolados desta bactéria. Este método permitiu a amplificação dos genes *pld*, *rpob* e *16S* de *C. pseudotuberculosis* diretamente a partir de amostras clínicas. Já Almeida *et al.* (2017) reportaram a eficiência do método quadruplex PCR para distinção dos biovares Equi e Ovis.

No que diz respeito a tratamento das enfermidades causadas por *C. pseudotuberculosis*, as classes mais comuns de antibióticos (ampicilina, clorafenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina, neomicina) são eficientes em prevenir o crescimento e multiplicação bacteriana *in vitro* (MUCKLE e GYLES, 1982; JUDSON e SONGER, 1991). Porém, o uso de antibióticos nem sempre é eficaz *in vivo* devido a natureza refratária dos abscessos da LC que possuem uma cápsula espessa. Nesse caso, recomenda-se o uso de antibióticos de 4 a 6 semanas para diminuir a recorrência dos abscessos (WILLIAMSON, 2001). Senturk e Temizel (2006) avaliaram que a combinação de rifamicina e oxitetraciclina é eficiente no tratamento da LC em ovinos. Baird (2006) sugere cautela ao considerar o uso desses antibióticos, pois a rifamicina já apresentou toxicidade e as bactérias desenvolveram resistência rapidamente quando comparado a outros antibióticos. A remoção cirúrgica e a punção e lavagem dos abscessos com soluções de iodo também estão entre as opções de tratamento, apesar de não serem os métodos ideais (WASHBURN, *et al.*, 2009; SANTIAGO *et al.*, 2013). Santos *et al.* (2019) analisaram os efeitos de uma pomada à base de nanopartículas de prata no tratamento de lesões caseosas pós-cirurgia. Os animais tratados com essa pomada apresentaram cura mais rápida, menor contagem de leucócitos e menor titulação de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis*. Por outro lado, Kalil *et al.* (2019) observaram que uma pomada a base de própolis verde foi capaz de cicatrizar feridas pós-operatórias mais rápido do que a solução de 10% de iodo em ovinos, além de inibir o crescimento de vinte e três isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*. Embora os resultados sejam promissores, ainda não há

um tratamento ideal e, dessa forma, a busca por vacinas também tem sido alvo de pesquisas.

A primeira vacina contra a LC foi desenvolvida a partir de uma cultura formalizada de *C. pseudotuberculosis* em adjuvante de alumínio em 1957 (EGGLETON *et al.*, 1991). Desde então, diversas formulações de vacinas têm sido testadas, como a viva atenuada (SIMMONS, HODGSON e STRUGNELL, 1997), a inativada (CAMERON, MINNAAR e PURDOM, 1969; FONTAINE *et al.*, 2006), com toxóides (ALVES e OLANDER, 1998), e de DNA (DE ROSE *et al.*, 2002). A maioria das vacinas disponíveis comercialmente para a LC são combinadas com vacinas para outros patógenos do gênero *Clostridium*, e baseiam-se na inativação da fosfolipase D (EGGLETON *et al.*, 1991b; PATON *et al.*, 2003; DORELLA *et al.*, 2006). Dentre elas estão a Glanvac™, a Caseous D-T™ e a Biodectin® (EGGLETON *et al.*, 1991; DORELLA *et al.*, 2009; ALVARENGA, 2017). No entanto, essas vacinas não são capazes de proteger completamente os animais suscetíveis e nem podem ser utilizadas em todos os hospedeiros (BRUM *et al.*, 2017). Uma vacina atenuada de *C. pseudotuberculosis* 1002 foi licenciada para uso comercial no Brasil em 2002 para ser administrada por via subcutânea em caprinos e ovinos anualmente (DORELLA *et al.*, 2009), porém não apresenta resultados satisfatórios.

Atualmente, estudos continuam a ser realizados na tentativa de encontrar vacinas mais eficientes. Ribeiro *et al.* (2014) avaliaram o potencial protetor de uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* deficiente na aquisição de ferro em modelo murino, os resultados mostraram que 80% dos animais imunizados sobreviveram após o desafio com uma linhagem virulenta. A busca por proteínas recombinantes imunogênicas também tem sido frequente. Droppa-Almeida *et al.* (2016) observaram que a proteína recombinante rCP40 induziu respostas imunes em camundongos capazes de protegê-los. De modo similar, Brum *et al.* (2017) relataram imunogenicidade da proteína esterase recombinante rCP09720, a qual induziu altos níveis de IgG1 e IgG2a.

2.4 Patogênese e resposta a estresses ambientais

A infecção por *C. pseudotuberculosis* ocorre, geralmente, via mucosas ou feridas na pele. O processo de infecção pode ser dividido basicamente em três etapas: na primeira (dia 1-4) há o recrutamento de neutrófilos e drenagem dos linfonodos, na segunda (dia 5-10) há o desenvolvimento do piogranuloma e a terceira caracteriza-se pelo amadurecimento e persistência do piogranuloma (DORELLA *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2012). Na forma superficial da doença os abscessos caseosos nos linfonodos apresentam conteúdo purulento de coloração amarelo-esverdeada e são envolvidos por uma cápsula fibrosa (SOUZA *et al.*, 2014). Isso ocorre porque a massa central dos linfonodos contém macrófagos e eosinófilos mortos envolvidos por uma camada de tecido fibrótico com agregados de linfócitos (DORELLA *et al.*, 2009). Na forma visceral os abscessos são encontrados principalmente no parênquima pulmonar, fígado, rins e baço. Vários estudos já demonstraram que a resposta imune do hospedeiro frente a este patógeno é complexa e requer tanto a imunidade celular quanto a humoral, sendo a resposta imune celular mais eficaz (GARG e CHANDIRAMANI, 1985).

Diversos fatores estão envolvidos na virulência de *C. pseudotuberculosis*, sendo os principais a fosfolipase D e os lipídios tóxicos presentes na parede celular. A fosfolipase D hidrolisa ligações fosfodiéster na esfingomielina da membrana celular contribuindo para a disseminação da bactéria, além de apresentar atividade citotóxica (SONGER, 1997; BAIRD e FONTAINE, 2007). Os lipídeos tóxicos da parede celular, por sua vez, também exercem toxicidade local a qual afeta os leucócitos (CARNE, WICKHAM e KATER, 1956), além de protegerem a bactéria das enzimas hidrolíticas do hospedeiro (HARD, 1972). O sistema de captação de ferro também é um importante fator de virulência. Billington *et al.* (2002) observaram que um mutante *fagB(C)* teve menor habilidade de sobreviver e causar abscessos em ovinos experimentalmente infectados. Além desses, serina protease CP40, neuraminidase H, superóxido dismutase C, adesina SpaC e proteína quinase G são outros fatores importantes para a virulência de *C. pseudotuberculosis* (CORRÊA *et al.*, 2018).

Além dos fatores de virulência, proteínas bacterianas que atuam em resposta aos estresses ambientais também podem ser importantes para a manutenção do patógeno no hospedeiro. Pacheco *et al.* (2012) demonstraram que o fator alternativo sigma E de *C. pseudotuberculosis* é requerido para a resistência frente ao estresse nitrosativo. Gomide *et al.* (2018) num estudo do transcriptoma de *C. pseudotuberculosis* 258 sob choque térmico,

observaram a expressão de genes cujos produtos estão relacionados à sobrevivência bacteriana. Resultados similares foram vistos por Pinto *et al.* (2014) após cultivo de *C. pseudotuberculosis* 1002 em condições de estresse ácido, osmótico e térmico. Ibraim *et al.* (2019) por sua vez relataram que a restrição de ferro desencadeou a expressão diferencial de diversos genes em *C. pseudotuberculosis*. Genes envolvidos em processos metabólicos do nitrogênio, processos biossintéticos e componentes celulares tiveram aumento significativo na expressão. Se por um lado a restrição de ferro pode ser um estresse, por outro a presença do ferro em sua forma reduzida potencializa a toxicidade do oxigênio gerando um estresse oxidativo (TOUATI, 2000). Durante o processo patogênico, *C. pseudotuberculosis* é capturada por células fagocíticas e pode sobreviver dentro de macrófagos por mais de 48 horas (STEFANSKA, *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é um dos principais a serem enfrentados nessas células. Esse tipo de estresse gera espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam DNA, RNA, proteínas e lipídeos (CABISCOL, TAMARIT e ROS, 2000).

Em casos como este, os patógenos bacterianos são capazes de alterar a expressão gênica, ativando genes cujos produtos auxiliam na sobrevivência (CHOWDHURY *et al.*, 1996). A partir daí, a proteômica tem se mostrado fundamental para o entendimento funcional desses produtos (PANDEY e MANN, 2000) uma vez que torna possível a caracterização de proteínas diferencialmente produzidas, bem como a determinação da interação entre elas. De acordo com Chambers *et al.* (2000) a análise do proteoma pode fornecer uma visão conjunta de processos individuais de uma doença. Através da proteômica comparativa, Silva *et al.* (2017) observaram que a linhagem *C. pseudotuberculosis* 1002, quando recuperada após a infecção em modelo murino, passou a expressar novamente diversos fatores de virulência, como a CP40 proteinase e a fosfolipase D. Proteínas relacionadas à virulência de *C. pseudotuberculosis* 1002 não foram observadas na linhagem apenas cultivada *in vitro*. Esses dados apontam que genes bacterianos podem ser ativados em determinadas condições ambientais. Dessa forma, as análises proteômicas podem contribuir para o conhecimento das proteínas produzidas e de suas funções e interações sob diversas condições.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar *in silico* as proteínas de *C. pseudotuberculosis* 1002 diferencialmente abundantes sob estresse oxidativo, buscando avaliar possíveis relações dessas proteínas com a resistência e patogenicidade da bactéria. Além disso, as proteínas identificadas foram analisadas quanto ao seu potencial como alvos para drogas, de modo a vislumbrar métodos de tratamento mais eficazes para doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*.

3.2 Objetivos específicos

- Inferir a função proteica com base em dados disponíveis na literatura e em banco de dados como UniProt e NCBI;
- Identificar possíveis envolvimento das proteínas em processos biológicos importantes para a resistência do patógeno ao estresse oxidativo e virulência bacteriana;
- Predizer a localização e as interações das proteínas diferencialmente abundantes sob estresse oxidativo;
- Predizer a essencialidade das proteínas para o patógeno e homologia com os proteomas dos hospedeiros bovino e caprino.
- Obter modelos de estruturas tridimensionais das proteínas essenciais e não-homólogas aos hospedeiros.
- Predizer compostos naturais de plantas que apresentam maior afinidade de ligação e ligações de hidrogênio ao sítio ativo das proteínas diferencialmente abundantes.

4. METODOLOGIA

4.1 Ensaio de estresse oxidativo, extração e separação de proteínas

Essas etapas dos experimentos foram realizadas pelo nosso grupo de pesquisa da Universidade Federal da Bahia (UFBA) em colaboração com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). *C. pseudotuberculosis* 1002 foi cultivada em BHI a 37°C, por 48h. Para o ensaio de estresse oxidativo a linhagem foi submetida a 15 µM de plumbagina e as proteínas extraídas na Densidade Óptica de 0,4 nm. A extração de proteínas citoplasmáticas foi realizada segundo Silva *et al.* (2017). Após foi adicionado um coquetel inibidor de proteases (Merck, Alemanha) e as amostras foram concentradas, quantificadas e armazenadas a -80 °C até a utilização. A separação das proteínas foi realizada através de gel bidimensional SDS-PAGE. A primeira dimensão foi realizada utilizando tiras Immobiline DryStrip (GE Healthcare, EUA) de 18cm com gradiente de pH 3-10NL imobilizado. As amostras protéicas foram marcadas com os fluoróforos Cy3 e Cy5; já o fluoróforo Cy2 foi utilizado para a marcação de quantidades iguais das duas amostras para padrão interno, conforme as recomendações do fabricante (GE Healthcare, EUA). A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no equipamento IPGphor 2 (GE Healthcare, EUA), segundo recomendações do fabricante. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12% selado com agarose, utilizando um sistema Ettan DaltSix (GE Healthcare, EUA). As imagens dos géis foram geradas utilizando o Image Scanner II (GE Healthcare, EUA) e analisadas com o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, EUA). Para avaliar as diferenças significativas dos *spots* entre as diferentes amostras dos géis ($p < 0,05$) foi utilizado o teste ANOVA.

4.2 Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Após as análises estatísticas, os *spots* com diferenças quantitativas significativas foram excisados dos géis com o auxílio de ponteiras descartáveis e foram adicionados a cada amostra 15µL de Tripsina Gold (Promega, EUA), segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram concentradas para o volume de 10µL em SpeedVac® e os peptídeos foram purificados utilizando colunas Zip-Tip C18 (Millipore, EUA). A identificação das proteínas por espectrometria de massas MS/MS foi realizada utilizando o espectrômetro MALDI TOF-TOF Autoflex III TM (Brucker Daltonics, EUA), segundo as recomendações do

fabricante. O programa MASCOT® (<http://www.matrixscience.com>) foi utilizado para a busca por similaridades com sequências bacterianas já depositadas no banco de dados do NCBI-nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.3 Busca manual das proteínas identificadas e predição de localização subcelular

Neste trabalho, as sequências FASTA de todas as 15 proteínas diferencialmente abundantes de *C. pseudotuberculosis* quando submetida ao estresse oxidativo foram recuperadas da base de dados *universal protein* - UniProt (<http://www.uniprot.org>). Em seguida, foi realizada uma revisão bibliográfica para inferência dos possíveis papéis desempenhados por cada proteína. As buscas foram realizadas por meio das plataformas NCBI PubMed, Scielo e Google Scholar, utilizando termos relativos aos genes e proteínas de acordo com a tabela 1, além dos termos: estresse oxidativo, proteoma, *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A localização subcelular das proteínas foi predita através do software SurfG+. Esta ferramenta utiliza um arquivo de proteína FASTA como entrada, analisa individualmente cada sequência e gera a previsão da localização (BARINOV *et al.*, 2009) como: exposta na superfície, secretada ou citoplasmática.

4.4 Análise das interações proteína-proteína

Interações proteína-proteína foram preditas através da ferramenta computacional *search tool for the retrieval of interacting genes/proteins* - STRING (<http://string-db.org>) de acordo com Szklarczyk *et al.* (2019), considerando o valor de confiança igual a 0.4 e utilizando *C. pseudotuberculosis* como organismo de referência. Esta ferramenta disponibiliza dados de interação proteína-proteína mostrando associações diretas e indiretas entre elas. Além disso, o STRING agrega em sua plataforma dados experimentais e preditos, atribuindo um escore de confiança a cada interação (GUIMARÃES, 2017). A partir da rede de interações gerada é possível identificar as seguintes associações: interações conhecidas de banco de dados e determinadas experimentalmente, vizinhança genômica, fusão gênica, co-ocorrência gênica entre espécies, mineração de dados da literatura, coexpressão e homologia proteica.

4.5 Predição de alvos para drogas e análise de docking molecular

Inicialmente, a essencialidade das proteínas foi predita por meio do servidor PBIT (<http://www.pbit.bicnirrh.res.in/index.php>) de acordo com Shende *et al.* (2017). Este servidor realiza uma análise por BLASTp contra sequências de genes essenciais contidas no banco de dados *essential genes* (DEG). Posteriormente a homologia com o proteoma dos hospedeiros bovino e caprino foi avaliada por BLASTp no servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) utilizando os parâmetros E-value = 0.0001, bit score ≥ 100 e identidade $\geq 35\%$ como critérios de seleção de acordo com Hassan *et al.*, (2014).

Em seguida a predição estrutural das proteínas essenciais não-homólogas foi realizada por modelagem comparativa de homologia utilizando o software MHOLine (<http://www.mholline2.Incc.br/?page=1>). Este software combina vários programas como HMMTOP, BLAST, MODELLER e PROCHECK para gerar modelos proteicos em 3D. A qualidade dos modelos selecionados foi alta ($\geq 50\%$ e $< 75\%$) e média para boa ($\geq 35\%$ e $< 50\%$). Subsequentemente, o sítio ativo de cada proteína foi predito por meio do algoritmo DoGSiteScorer, disponível no servidor ProteinPlus (<https://proteins.plus/>). Este algoritmo identifica os potenciais sítio de ligação na proteína e seus aminoácidos constituintes (FAVERO *et al.*, 2020).

As proteínas selecionadas como alvos foram submetidas ao AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2009) para visualização e seleção do sítio de ligação identificado anteriormente. O modelo gerado foi convertido em formato PDBQT. Para análise de acoplamento molecular foram utilizados 5.008 compostos obtidos da biblioteca de compostos naturais do ZINC (STERLING e IRWIN, 2015). Cada um dos compostos foram analisados de acordo com sua ligação às proteínas alvo mediante AutoDock Vina. Em seguida, os dez melhores ligantes foram identificados com base na sua afinidade de ligação à proteína por meio do script `vina_screen_get_top.py` (TROTT e OLSON, 2009). A visualização da interação entre esses compostos e a proteína de interesse foi realizada por meio do software UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004). Nesta etapa, o ligante com menor afinidade de ligação e maior número de ligações de hidrogênio foi considerado o melhor candidato.

5. RESULTADOS

5.1 Proteínas identificadas: funções e localização

Em experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa da UFBA em colaboração com a UFMG, foram identificadas 15 proteínas de *C. pseudotuberculosis* que foram diferencialmente abundantes na condição de estresse oxidativo. Dentre elas, 12 foram mais abundantes na condição de estresse e 3 menos abundantes nessa mesma condição (tabela 1). A enzima superóxido dismutase, conhecida por atuar no combate ao estresse oxidativo, está entre as menos abundantes.

Tabela 1 - Proteínas de *C. pseudotuberculosis* diferencialmente abundantes identificadas por MALDI-TOF

Locus Tag	Gene	Spot/Proteína	Função
WP_013 241703. 1	<i>atpA</i>	11 - ATP sintase subunidade alfa	Produção de ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons na membrana.
WP_013 241771. 1	<i>ddl</i>	9 - D-alanina-D-alanina ligase	Formação da parede celular.
WP_013 242659. 1	<i>groEL</i>	14 - Chaperonina 60kDa	Previne o dobramento incorreto e promove o redobramento adequado de proteínas
WP_013 241130. 1	<i>hemC</i>	3 - Forfobilinogênio deaminase*	Tetra-polimeriza o monopirrol PBG no hidroximetilbilano pré-uroporfirinogênio
WP_013 241362. 1	<i>manC</i>	26 - Manose-1-fosfato guaniltransferase	Nucleotidiltransferase
WP_013 242455. 1	<i>mdh</i>	18 - Malato desidrogenase	Catalisa a oxidação reversível do malato a oxaloacetato
WP_013 241964. 1	<i>pgk</i>	4 - Fosfoglicerato quinase	Envolvida na via de síntese do piruvato

WP_014 1551.1	<i>pip</i>	25 - Prolina iminopeptidase*	Catalisa a liberação da prolina N-terminal de peptídeos
WP_014 522221. 1	<i>pnp</i>	19 - Poliribonucleotídeo nucleotidiltransferase	Catalisa a fosforólise de polirribonucleotídeos de fita simples de forma processual na direção 3' para 5'
WP_013 242650. 1	<i>ppa</i>	12 - Pirofosfatase inorgânica	Catalisa a hidrólise da pirofosfatase inorgânica (PPi) formando dois íons fosfato
WP_013 240878. 1	<i>ppiA</i>	5 - Peptidil-prolil cis- trans isomerase	Acelera o dobramento de proteínas. Catalisa a isomerização cis-trans de ligações peptídicas.
WP_013 242852. 1	<i>sodA</i>	23 - Superóxido dismutase*	Degradação de radicais superóxidos
WP_013 241957. 1	<i>tal</i>	1 - Transaldolase	Equilíbrio de metabólitos na via das pentoses-fosfato
WP_013 242461. 1	<i>tig</i>	13 - Fator trigger	Mantém proteínas recém sintetizadas na conformação aberta
WP_014 522115. 1	<i>tuf</i>	15 - Fator de elongação Tu	Atua na ligação de aminoácidos de tRNA ao sítio A dos ribossomos

* Proteínas menos abundantes na condição de estresse oxidativo.

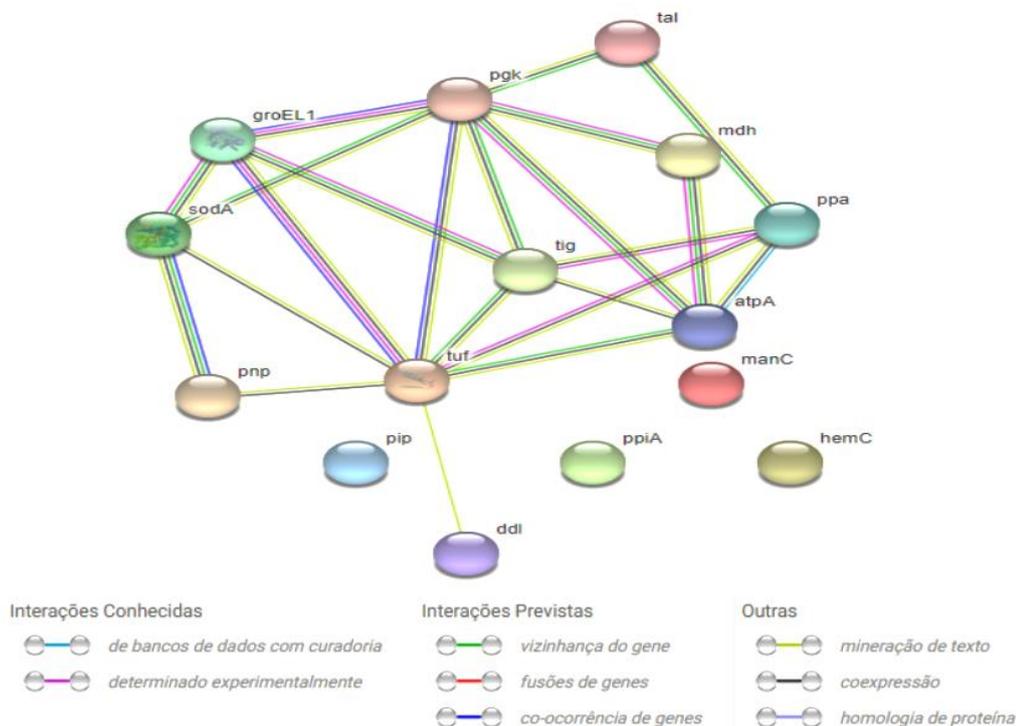
Fonte: Função proteica obtida na plataforma UniProt.

5.2 Interações proteína-proteína

Proteínas podem interagir de forma direta ou indireta, formando associações funcionais. Buscando inferir se as proteínas identificadas neste trabalho interagem, submetemos as sequências de aminoácidos a análise na plataforma STRING. Foi possível observar que vários genes que codificam proteínas homólogas às encontradas são coexpressos e/ou encontram-se vizinhos (figura 2). Nesse aspecto, é importante mencionar a coexpressão de genes que codificam proteínas com funções correlatas e complementares: *groEL* e *tig*; *groEL* e *tuf*; *groEL* e *sodA*, *tuf* e *tig*. Além disso, proteínas envolvidas em processos metabólicos e biossintéticos (Tal e Ppa; Ppa e AtpA; Mdh e AtpA) também são codificadas por genes coexpressos. Vizinhança gênica, coexpressão e

mineração textual foram as interações mais frequentes, vide apêndice A. Observa-se também que algumas proteínas co-ocorrem e apresentam interações determinadas experimentalmente (figura 1).

Figura 1 - Rede de interações entre os genes codificantes das proteínas de *C. pseudotuberculosis* 1002.



Fonte: Autoral, figura obtida de análises no STRING.

5.3 Proteínas alvo para drogas e *docking* molecular

As sequências das proteínas mais abundantes na fase *in vitro* deste estudo foram comparadas por BLASTp contra os proteomas bovino e caprino. Como resultado, identificamos que as proteínas não-homólogas ao proteoma de nenhum dos hospedeiros foram Ddl e Ppa. Além disso, de acordo com a predição realizada no PBIT, essas proteínas são essenciais para o patógeno. Desse modo, Ddl e Ppa foram selecionadas para análise de *docking* molecular.

Tabela 2 - Homologia com o proteoma dos hospedeiros e análise de essencialidade dos 12 genes regulados positivamente na análise proteômica.

Gene	Proteínas	Essencialidade	Homologia com o hospedeiro	
			Bovino	Caprino
<i>atpA</i>	ATP sintase subunidade alfa	Sim	Sim	Sim
<i>ddl</i>	D-alanina-D-alanina ligase	Sim	Não	Não
<i>groEL</i>	Chaperonina 60kDa	Sim	Sim	Sim
<i>manC</i>	Manose-1-fosfato guaniltransferase	Sim	Não	Sim
<i>mdh</i>	Malato desidrogenase	Sim	Sim	Sim
<i>pgk</i>	Fosfoglicerato quinase	Sim	Sim	Sim
<i>pnp</i>	Poliribonucleotídeo nucleotidiltransferase	Sim	Sim	Sim
<i>ppa</i>	Pirofosfatase inorgânica	Sim	Não	Não
<i>ppiA</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Sim	Sim	Sim
<i>tal</i>	Transaldolase	Sim	Sim	Não
<i>tig</i>	Fator trigger	Sim	Sim	Sim
<i>tuf</i>	Fator de elongação Tu	Sim	Sim	Sim

Fonte: Tabela autoral obtida de análises realizadas no PBIT e NCBI.

As proteínas Ddl e Ppa foram analisadas quanto a ligação com 5.008 compostos naturais por meio do software AutoDock Vina. Em seguida, os dez melhores ligantes para cada proteína alvo foram analisados, por intermédio do servidor Chimera, de acordo com o escore da afinidade de ligação e o número de ligações de hidrogênio. O melhor composto para cada proteína foi aquele que apresentou maior número de ligações de hidrogênio e menor energia de afinidade de ligação (tabela 3). Vale ressaltar que o escore da afinidade

de ligação está relacionado a energia necessária para a ligação, ou seja, quanto menor, melhor.

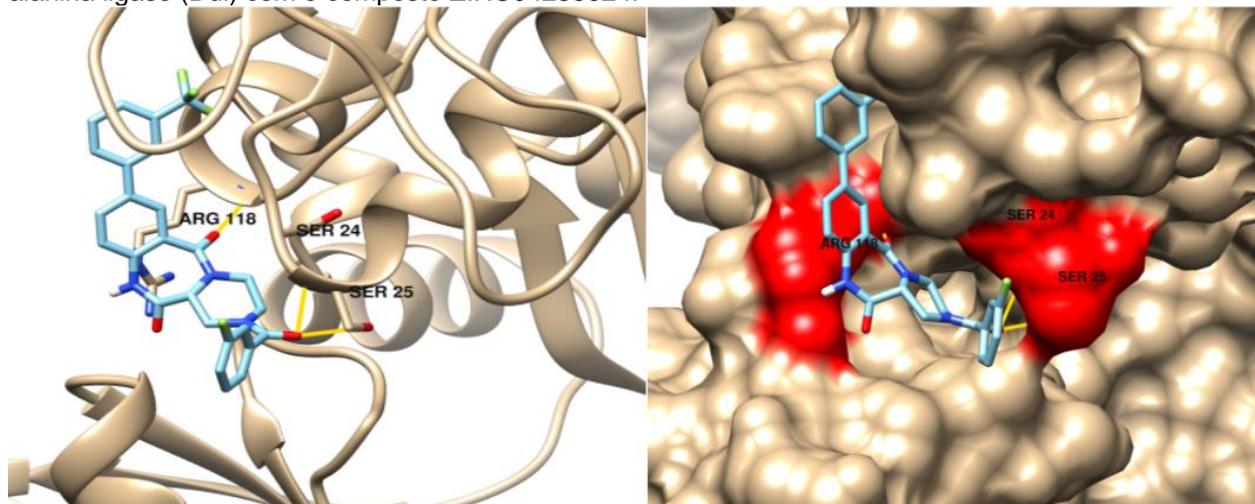
De acordo com as análises, a proteína Ddl (WP_013241771.1) apresenta três resíduos do sítio ativo ligados ao composto ZINC04235924 (figura 4a). Este composto faz três ligações de hidrogênio com os resíduos ARG118, SER24 e SER25 e apresenta afinidade de ligação -10 (figura 2). Curiosamente, este ligante também esteve entre os dez melhores para a Ppa, fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos ARG30 e LYS126 e apresentando afinidade -8.9. Para a proteína Ppa (WP_013242650.1) o melhor composto encontrado foi ZINC015709489 (figura 4b), o qual faz três ligações de hidrogênio com os resíduos ARG30, LYS126 e TYR42 (figura 3).

Tabela 3 - Afinidade de ligação predita por AutoDock Vina e ligações de hidrogênio do melhor ligante para cada proteína alvo e do ligante ZINC0435924 com a proteína WP_013242650.1.

Proteína alvo (locu tag)	ZINC ID	PubChem ID	Afinidade de ligação	Ligações de hidrogênio	Resíduos
WP_01324177 1.1	ZINC0423 5924	11884217	-10	3	ARG118 SER24 SER25
WP_01324265 0.1	ZINC0157 09489	26763570	-8.4	3	ARG30 LYS126 TYR42
WP_01324265 0.1	ZINC0423 5924	11884217	-8.9	2	ARG30 LYS126

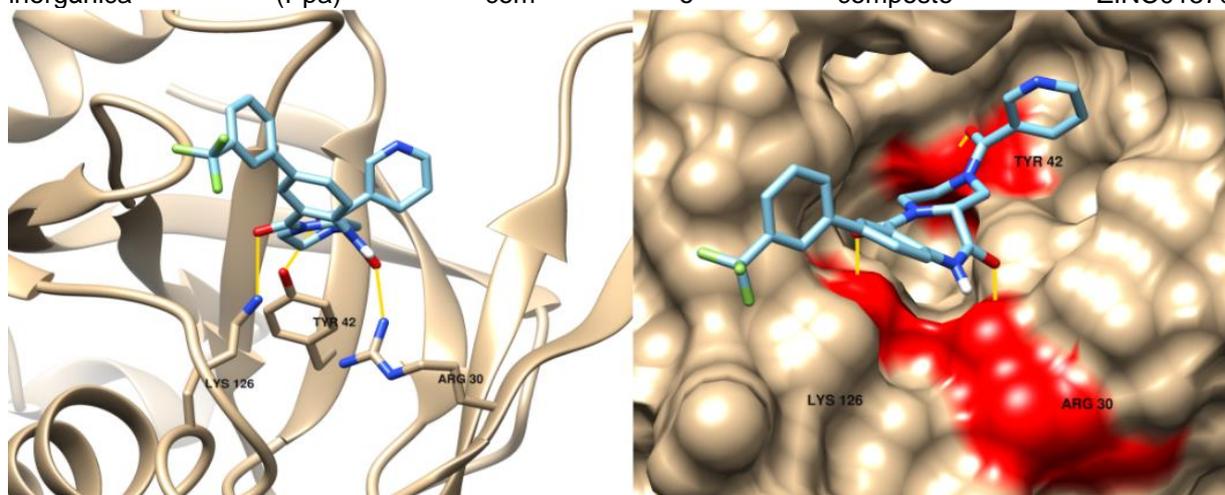
Fonte: Autoral.

Figura 2 - Representação tridimensional da análise do docking molecular para sítios ativos da D-alanina-D-alanina ligase (Ddl) com o composto ZINC04235924.



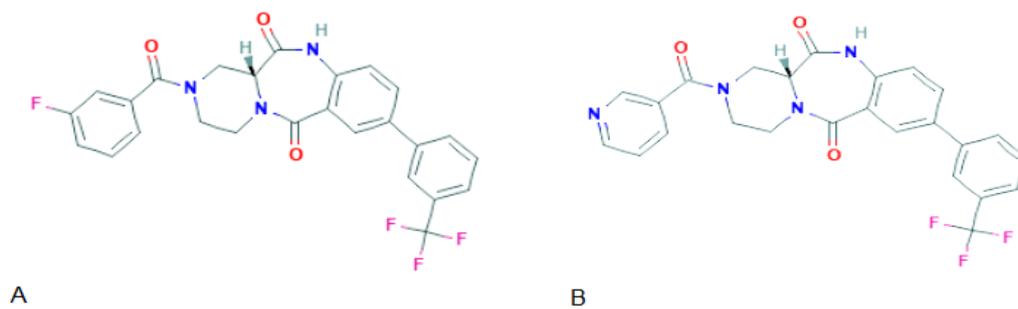
Fonte: Autoral.

Figura 3 - Representação tridimensional da análise do docking molecular para sítios ativos da Pirofosfatase inorgânica (Ppa) com o composto ZINC015709489.



Fonte: Autoral.

Figura 4 - Representação bidimensional da estrutura dos compostos.



A: ZINC04235924 (11884217). B: ZINC015709489 (26763570). Fonte: PubChem.

6. DISCUSSÃO

Durante o processo patogênico, bactérias como *C. pseudotuberculosis* precisam sobreviver a diversos ambientes no hospedeiro, como o estresse oxidativo das células fagocíticas. As proteínas produzidas quando uma bactéria é submetida aos estresses ambientais podem ser fundamentais para a permanência no hospedeiro. Nesse trabalho foram analisadas 15 proteínas diferencialmente abundantes em *C. pseudotuberculosis* quando submetida ao estresse oxidativo. Várias dessas proteínas são codificadas por genes vizinhos e/ou coexpressos. A vizinhança gênica sugere que se dois genes são encontrados em proximidade em vários genomas, seus produtos podem ter alguma relação funcional (EISENBERG *et al.*, 2000). Já a coexpressão pode indicar quais genes estão ativos simultaneamente, o que geralmente indica que eles são ativos no mesmo processo biológico (VAN DAM *et al.*, 2017).

Entre as proteínas identificadas, superóxido dismutase, forfobilinogenio deaminase e prolina iminopeptidase foram menos abundantes na condição de estresse. A superóxido dismutase, por sua vez, catalisa a conversão de radicais superóxidos em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio no primeiro passo de uma série de reações que removem os radicais livres (WU, C *et al.*, 1998). A eficiência dessa proteína contra o danos oxidativos foi testada por Bastistoni *et al.* (2000), onde observou-se uma sobrevivência intracelular significativamente maior para as linhagens de *Escherichia coli* que super-expressavam o gene *sodC* clonado em um plasmídeo. Intrigantemente, El Shafey e Ghanem (2015) não notaram relação entre a regulação de *sodA* e o tratamento com agentes geradores de radicais superóxidos em *E. coli* expressando *sodA* oriundo de *Corynebacterium glutamicum*. Resultados similares foram observados por Merkamm e Guyonvarch (2015) em *Corynebacterium melassecola*. Podemos dizer que o mesmo foi observado neste trabalho, uma vez que a condição de estresse não causou um aumento na produção da superóxido dismutase. Apesar disso, é possível que outro sistema de detoxificação, embora não identificado, tenha sido ativado para compensar o déficit da SodA.

Outra proteína menos abundante foi a forfobilinogênio deaminase, uma enzima que atua na via biossintética do heme catalisando a tetrapolimerização do monopirrol PGB em hidroximetilbilano pré-uroporfirinogênio (THOMAS e JORDAN, 1986). O heme é um

importante reservatório de ferro para muitos patógenos bacterianos (BENSON e RIVERA, 2013) e o ferro por sua vez é um elemento crucial para o crescimento e virulência (MARTÍNEZ, DELGADO-IRIBARREN e BAQUERO, 1990). Sendo assim, expressar proteínas da via biossintética do heme pode ser vantajoso. No entanto, os genes dessa via de biossíntese parecem responder a outros fatores, como a limitação de heme (MCNICHOLAS *et al.*, 1997).

A prolina iminopeptidase catalisa a remoção da prolina N-terminal de peptídeos em bactérias, porém a função biológica dessa proteína e a regulação do seu gene ainda não foram caracterizadas (ZHANG *et al.*, 2007). Todavia, Zhang *et al.* (2007) observaram que o gene *pip* é necessário para a patogenicidade de *Xanthomonas campestris*. A cepa com o gene *pip* interrompido apresentou virulência significativamente menor do que a linhagem selvagem.

Dentre as proteínas que foram mais abundantes na condição de estresse, há relatos na literatura de que a transaldolase e a malato desidrogenase tem ligação direta à resposta ao estresse oxidativo. A transaldolase é uma enzima que atua no ramo não oxidativo da via das pentoses fosfato (SAMLAND *et al.*, 2012). Vatanaviboon *et al.* (2002) avaliaram o papel desta proteína na proteção de *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* contra a toxicidade gerada por radicais superóxido. Os resultados demonstraram que a linhagem mutante com *talA* inativo foi mais sensível ao estresse que a linhagem selvagem. Os autores hipotetizaram que esta sensibilidade foi devido ao decréscimo de NADPH da via das pentoses-fosfato.

A enzima malato desidrogenase, por exemplo, além de atuar nos processos de respiração celular, pode atuar na compensação de estresses metabólicos (EPRINTSEV *et al.*, 2014). Oh *et al.* (2002) notaram que cepas de *E. coli* mutantes *mdh* foram mais sensíveis ao H₂O₂ do que o tipo selvagem. Por outro lado, o pré-tratamento das culturas mutantes com oxaloacetato, antes do tratamento com H₂O₂, restaurou a sensibilidade a níveis semelhantes do tipo selvagem. Estes resultados indicam que a malato desidrogenase é importante na proteção contra danos oxidativos em *E. coli*, uma vez que esta enzima converte o malato a oxaloacetato.

A polirribonucleotídeo nucleotidyltransferase é uma enzima que catalisa reversivelmente a fosforólise 3' - 5' de polirribonucleotídeos, liberando difosfatos de nucleosídeo, e o inverso 5' - 3' polimerizando ribonucleosídeos difosfatos, liberando fosfato inorgânico (BRIANI, CARZANIGA e DEHÒ, 2016). Não há muitos relatos na literatura sobre a atuação dessa proteína, no entanto Khan *et al.* (2017) a cita como um marcador geral de estresse. Além disso, o gene *pnp* que a codifica também codifica a polinucleotídeo fosforilase, uma proteína relatada por Wu *et al.* (2009) na proteção de *E. coli* frente ao estresse oxidativo. Curiosamente, o gene *pnp* é coexpresso, co-ocorre e encontra-se vizinho do gene *sodA*.

Condições não ideais, como a de estresse oxidativo, podem causar a perda da estrutura secundária e terciária de proteínas, impactando na sua atividade, solubilidade e estabilidade (DAHL, GRAY e JAKOB, 2015). PPlases e chaperonas moleculares são essenciais para lidar com essas condições (KROMINA, IGNATOV e ABDEEVAM, 2008; DAHL, GRAY e JAKOB, 2015). Kromina, Ignatov e Abdeevam (2008) afirmaram que o envolvimento das enzimas da superfamília peptidil-prolil cis-trans isomerase na patogenicidade está relacionado à modificação de proteínas transmembrana e secretadas do patógeno para escapar ou superar a resposta imune do hospedeiro. Além disso, essas enzimas podem acelerar o reparo de danos conformacionais em virtude de sua capacidade de reverter a isomerização de prolinas (VISICK e CLARKE, 1995). Outra proteína identificada neste trabalho que também apresenta atividade PPlase é a fator trigger (KRAMER *et al.*, 2004). Tig é a única chaperona bacteriana associada ao ribossomo, onde interage com os polipeptídeos antes mesmo de outras chaperonas como DnaK e GroEL (HOFFMAN, BUKAU e KRAMER, 2010). Wu *et al.* (2011) a partir da deleção do gene *tig* em *Streptococcus suis* observaram que a tolerância ao estresse ácido e oxidativo, bem como a expressão de alguns genes envolvidos na virulência diminuiu. As chaperonas moleculares são proteínas estruturalmente diversas e geneticamente não relacionadas que reconhecem proteínas em conformações não nativas e interagem com elas (BRAIG, 1998). Wikkins, Homer e Beighton (2002) notaram que em *Streptococcus mutans* a chaperona 60 kDa foi uma das mais abundantes em células bacterianas cultivadas em pH 5,2. Segundo os autores, essa proteína deve ter sido super produzida para neutralizar os efeitos da acidificação ambiental.

Observamos que fator trigger e chaperona 60kDa são codificadas por genes vizinhos e coexpressos. Esses também são coexpressos e encontram-se em vizinhança gênica com *tuf*. Dessa forma, é possível que essas proteínas tenham atuado em conjunto em razão do estresse oxidativo.

O fator de alongação Tu atua na ligação de aminoácidos de tRNA ao sítio A dos ribossomos durante a síntese de proteínas (LUDWIG *et al.*, 1990). No entanto, funções associadas à virulência também têm sido sugeridas (HARVEY *et al.*, 2019). Em *Pseudomonas aeruginosa* Kunert *et al.* (2007) identificaram o fator de alongação Tu como uma proteína de ligação ao fator H do hospedeiro humano. A partir dessa ligação o patógeno utiliza as proteínas do hospedeiro (fator H e plasminogênio) para evadir o sistema imune.

Outras proteínas que foram identificadas nesse trabalho e que podem colaborar para a homeostase, resistência e virulência bacteriana são a ATP sintase subunidade alfa e a fosfoglicerato quinase. As ATP sintases são complexos multiproteicos encontrados nas membranas. Essas proteínas produzem ATP a partir de ADP utilizando um gradiente de prótons transmembrana. Além disso, Lu *et al.*, (2014) sugerem que a ATP sintase em bactérias patogênicas lidam com desafios excepcionais ao enfrentar condições de estresse. A fosfoglicerato quinase atua na via glicolítica onde transfere um grupo fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP produzindo 3-fosfoglicerato e ATP (REDDY e WENDISCH, 2014). De acordo com Trant *et al.* (2007) uma linhagem de *Brucella abortus* com o gene *pgk* deletado apresentou atenuação durante a infecção em macrófagos e camundongos BALB/c.

Proteínas que atuam em vias biossintéticas também podem ser fundamentais. O produto do gene *manC*, por exemplo, atua na via que sintetiza GDP-manose, um açúcar nucleotídico responsável pela manosição de muitos polissacarídeos da superfície celular bacteriana (JENSEN e REEVES, 2001). Mishra *et al.* (2012) observou que a deleção de *manC* em *Corynebacterium glutamicum* levou a deficiência de lipoglicanos da superfície celular. Desse modo, super expressar *manC* sob estresse oxidativo pode gerar uma proteção física do patógeno em virtude da formação de polissacarídeos.

Outras proteínas que atuam em reações biossintéticas são a Ddl e Ppa. D-alanina-D-alanina ligase catalisa a ligação de D-ala-D-ala na montagem de precursores de peptidoglicano (WU, D *et al.*, 2008). Em *Mycobacterium smegmatis* a super expressão de *ddl* confere resistência a D-cicloserina (FENG e BARLETTA, 2003), um agente antimicrobiano que impede a biossíntese da parede celular (DAVID *et al.*, 1969). Enzimas envolvidas na via D-Ala de biossíntese do peptidoglicano são possíveis alvos para design de drogas (BRUNING *et al.*, 2011). Já a pirofosfatase inorgânica desempenha um papel importante no metabolismo energético e é fundamental para reações biossintéticas como a síntese de proteínas, RNA e DNA em virtude da hidrólise do pirofosfato inorgânico (Lahti *et al.*, 1988). Neste estudo as proteínas Ddl e Ppa foram selecionadas como possíveis alvos para drogas. Essas proteínas são essenciais para o patógeno e não-homólogas aos hospedeiros, esta última característica é um fator importante uma vez que diminui o risco de efeitos colaterais por parte do hospedeiro (SAKHARKAR, SAKHARKAR e CHOW, 2008). Nas análises de docking molecular observamos uma alta afinidade de ligação dessas proteínas aos compostos naturais ZINC04235924 e ZINC015709489, respectivamente. O ligante ZINC04235924 também esteve entre os dez melhores para a Ppa, o que pode ser vantajoso como medida de tratamento. Considerando que essas proteínas são essenciais ao patógeno e foram mais abundantes na condição de estresse, a utilização desses compostos pode afetar a resistência bacteriana. Os compostos naturais deram origem à maioria das classes de antibióticos e ainda hoje continuam a ser uma fonte para a descoberta de novas moléculas (GENILLOUD, 2019). Desse modo, esses ligantes podem ser úteis para o design de novas drogas contra *C. pseudotuberculosis*.

Os resultados apresentados neste trabalho podem ser extrapolados para análises complementares e corroborativas como: nocaute e/ou superexpressão dos genes codificadores das proteínas encontradas, análises de coexpressão *in vitro* e avaliação físico-química e das dinâmicas de interação proteína-ligante.

7. CONCLUSÕES

As proteínas identificadas neste trabalho não apresentam sequência sinal para os sistemas clássicos de secreção e podem estar envolvidas na resistência de *C. pseudotuberculosis* ao estresse oxidativo direta ou indiretamente. Embora a superóxido dismutase tenha sido menos abundante na condição de estresse, essa redução pode ter sido compensada por outro sistema de detoxificação não identificado nas análises proteômicas realizadas. A partir da análise de interação proteína-proteína foi possível observar que várias delas são codificadas por genes coexpressos, e/ou vizinhos, o que sugere atuação conjunta nos mesmos processos celulares. Das proteínas identificadas nesse trabalho, Ddl e Ppa são essenciais para o patógeno e não-homólogas aos hospedeiros. Essas proteínas apresentaram alta afinidade de ligação aos compostos ZINC04235924 e ZINC015709489, respectivamente. Interessantemente, o ligante ZINC04235924 também esteve entre os dez melhores para a proteína Ppa.

8. REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, (422), 198-207. Março, 2003.

ALMEIDA, S. *et al.* Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar Ovis and Equi. **BMC veterinary research**, (13), 1-8. Setembro, 2017.

ALVARENGA, L. C. O. **Avaliação da imunogenicidade e proteção de vacinas recombinantes contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos**. 2017. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2017.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, Sobral, (33), 1-4, Agosto, 1997.

ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. . Uso de uma vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista brasileira de medicina veterinária**, Sobral, (20), 74-77, 1998.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Embrapa Caprinos**, Sobral, (74), p. 14, Setembro, 2007.

ALVES, J. R. A. *et al.* Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. **Tropical Animal Health and Production**, (52), 1945–1952, Janeiro, 2020.

ARNOLD K. *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. **Bioinformatics**, (22), 195-201, Janeiro, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/2/195/423760>. Acesso em: 5 nov 2020.

BAIRD, G. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. *The Veterinary Record*, Londres (159), 500, Outubro, 2006. Disponível em: <https://search.proquest.com/openview/669b2cbebca068f9a5ba4f2ac4be2d3c/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2041027>. Acesso em: 5 nov 2020.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, (137), 179-210, Novembro, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997507001211>. Acesso em: 5 nov 2020.

BARBOSA, E. F. L. **Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em pequenos ruminantes no estado de Goiás**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6007>. Acesso em: 5 nov 2020.

BARINOV, A. *et al.* Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. **Proteomics**, (9), 61-73, 2009.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.200800195>. Acesso em: 5 nov 2020.

BASTOS, B. L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. **Clinical & Cellular Immunology**, (4), 1-15. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Bruno_Bastos/publication/285983332_Corynebacterium_pseudotuberculosis_Immunological_responses_in_animal_models_and_zoonotic_potential/links/57a1262108ae5f8b25896fa6.pdf. Acesso em: 5 nov 2020.

BATTISTONI, A. *et al.* Increased expression of periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase enhances survival of Escherichia coli invasive strains within nonphagocytic cells. **Infection and immunity**, 68(1), 30-37, Janeiro, 2000. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/68/1/30.short>. Acesso em: 5 nov 2020.

BENSON, D. R.; RIVERA, M. Heme uptake and metabolism in bacteria. *In*: BANCI, L. **Metallomics and the Cell**, (12), Springer, Dordrecht, 2013. cap 9, 279-332. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5561-1_9. Acesso em: 5 nov 2020.

BILLINGTON, S. J. *et al.* Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS microbiology letters**, 208(1), 41-45, Fevereiro, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/208/1/41/486229>. Acesso em: 5 nov 2020.

BLUEGGEL, M.; CHAMRAD, D.; MEYER, H. E. Bioinformatics in proteomics. **Current pharmaceutical biotechnology**, 5(1), 79-88, Fevereiro, 2004. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpb/2004/00000005/00000001/art00009>. Acesso em: 5 nov 2020.

BRAGA, W. U.; CHAVERA, A.; GONZALEZ, A. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in highland alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record*, (159), 23-24, Julho, 2006. Disponível em: <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/159/1/23.short>. Acesso em: 5 nov 2020.

BRAGA, W. *et al.* A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in alpacas (*Lama pacos*) protects against a lethal challenge exposure. **Small Ruminant Research**, (72), 81-86, Outubro, 2007.

BRAIG, K. Chaperonins. **Current opinion in structural biology**, (8), 159-165, Abril, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959440X9880033X>. Acesso em: 5 nov 2020.

BRIANI, F.; CARZANIGA, T.; DEHÒ, G. Regulation and functions of bacterial PNPase. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 7(2), 241-258, Janeiro, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wrna.1328>. Acesso em: 5 nov 2020.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 51(1), 46-49, Janeiro,

1987. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255272/>. Acesso em: 5 nov 2020.

BRUM, A. A. *et al.* Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of Medical Microbiology**, 66(5), 635-642, Maio, 2017. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000477>. Acesso em: 5 nov 2020.

BRUNING, J. B. *et al.* Structure of the Mycobacterium tuberculosis D-alanine: D-alanine ligase, a target of the antituberculosis drug D-cycloserine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 55(1), 291-301, Janeiro, 2011. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/55/1/291.short>. Acesso em: 5 nov 2020.

BURRELL, D. H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Research in veterinary science**, 28(2), 234-237, Março, 1980. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003452881832753X>. Acesso em: 5 nov 2020.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, (3), 3-8, 2000. Disponível em: <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/56751/001562.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 5 nov 2020.

CAMERON, C. F.; SWART, C. M. A new liquid medium for the cultivation of *Corynebacterium pseudo-tuberculosis*. **Journal of the South African Veterinary Association**, 36(2), 185-188, Janeiro, 1965. Disponível em: https://journals.co.za/content/savet/36/2/AJA00382809_3367. Acesso em: 5 nov 2020.

CAMERON, C. M.; MINNAAR, J. L.; PURDOM, M. R. Immunizing properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls. **Onderstepoort journal of veterinary research**, 36(2), 211-216, Agosto, 1969. Disponível em: <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/53783/12cameron1969.pdf?sequence=1>. Acesso em: 5 nov 2020.

CARMO, F. B. do. *et al.* Prevalência de anticorpos contra a linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, 79(2), 293-296, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/28604>. Acesso em: 6 nov 2020.

CARNE, H. R.; WICKHAM, N.; KATER, J. C. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. **Nature**, 178(4535), 701-702, 1956. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/178701a0>. Acesso em: 5 nov 2020.

CASTRO, T. L. P. **Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo.** Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CHAMBERS, G. *et al.* Proteomics: a new approach to the study of disease. **The Journal of pathology**, 192 (3), 280-288, outubro, 2000. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1096-9896\(200011\)192:3%3C280::AID-PATH748%3E3.0.CO;2-L](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1096-9896(200011)192:3%3C280::AID-PATH748%3E3.0.CO;2-L). Acesso em: 6 nov 2020.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, N. A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. **JSM Chemistry**, 3(4), agosto, 2016.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, 65(1-2), 170-175, setembro, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092144880500235X>. Acesso em: 6 nov 2020.

CHOWDHURY, R.; SAHU, G. K.; DAS, J. Stress response in pathogenic bacteria. **Journal of Biosciences**, 21(2), 149-160, abril, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%252FBF02703105>. Acesso em: 6 nov 2020.

COLLINS, M. D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. **Microbiology**, 128(1), 129-149, janeiro, 1982. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-128-1-129>. Acesso em: 6 nov 2020.

CONNOR, K. M. *et al.* Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(7), 2633-2637, julho, 2000. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/38/7/2633.short>. Acesso em: 6 nov 2020.

CORRÊA, J. I. *et al.* Expression of six possible virulence factors of *C. pseudotuberculosis* in murine macrophage. **PUBVET**, 12(12), 1-8, dezembro, 2018. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/1c4c6536eb645d94a5ad2761d5ae4a93.pdf>. Acesso em: 6 nov 2020.

COSTA, L. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Veterinary microbiology**, 62(2), 135-143, maio, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113598002028>. Acesso em: 6 nov 2020.

COSTA, L. F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 1(1), 105-115, 2000. Disponível em: <https://cienciasmedicasbiologicas.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4248>. Acesso em: 6 nov 2020.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES III, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, 450(7172), 991-1000, dezembro, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature06525>. Acesso em: 6 nov 2020.

DAHL, J. U.; GRAY, M. J.; JAKOB, U. Protein quality control under oxidative stress conditions. **Journal of Molecular Biology**, 427(7), 1549-1563, abril, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283615001084>. Acesso em: 6 nov 2020.

DAVID, H. L.; TAKAYAMA, K.; GOLDMAN, D. S. Susceptibility of mycobacterial D-alanyl-D-alanine synthetase to D-cycloserine. **American review of respiratory disease**, 100(4), 579-581, 1969. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/arrd.1969.100.4.579?journalCode=arrd>. Acesso em: 6 nov 2020.

DE ROSE, R. *et al.* Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. **Veterinary immunology and immunopathology**, 90(1-2), 55-63, novembro, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242702002210>. Acesso em: 6 nov 2020.

DORELLA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, 37(2), 201-218, 2006. Disponível em: <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2006/02/v6018/v6018.html>. Acesso em: 6 nov 2020.

DORELLA, F. A. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert review of vaccines**, 8(2), 205-213, 2009. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14760584.8.2.205>. Acesso em: 6 nov 2020.

DROPPA-ALMEIDA, D. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, 34(8), 1091-1096, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15018757>. Acesso em: 6 nov 2020.

EGGLETON, D. G. *et al.* Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian veterinary journal**, 68(10), 317-319, outubro, 1991. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03085.x>. Acesso em: 9 nov 2020.

EGGLETON, D. G. *et al.* Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. **Australian veterinary journal**, 68(10), 322-325, outubro, 1991. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03088.x>. Acesso em: 9 nov 2020.

EISENBERG, D. *et al.* Protein function in the post-genomic era. **Nature**, 405(6788), 823-826, junho, 2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35015694?message=remove&free=2>. Acesso em: 9 nov 2020.

EL SHAFEY, H. M.; GHANEM, S. Regulation of expression of sodA and msrA genes of *Corynebacterium glutamicum* in response to oxidative and radiative stress. **Genetics and Molecular Research**, 14(1), 2104-2117, março, 2015. Disponível em: <https://www.geneticsmr.com/year2015/vol14-1/pdf/gmr4750.pdf>. Acesso em: 9 nov 2020.

ELLIS, T. M. *et al.* The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Australian veterinary journal**, 64(9), 261-263, setembro, 1987. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1987.tb15952.x>. Acesso em: 9 nov 2020.

EPRINTSEV, A. T. *et al.* Physicochemical, catalytic, and regulatory properties of malate dehydrogenase from Rhodovulum steppense bacteria, strain A-20s. **Biology Bulletin**, 41(6), 486-492, novembro, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1062359014050033>. Acesso em: 9 nov 2020.

FARIAS, A. E. M. *et al.* Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Tropical animal health and production**, 51(4), 745-752, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1748-7>. Acesso em: 9 nov 2020.

FAVERO, L. M. *et al.* In silico Prediction of New Drug Candidates Against the Multidrug-Resistant and Potentially Zoonotic Fish Pathogen Serotype III Streptococcus agalactiae. **Frontiers in genetics**, 11, 1024, agosto, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.01024/full?report=reader>. Acesso em: 9 nov 2020.

FENG, Z.; BARLETTA, R. G. Roles of Mycobacterium smegmatis D-alanine: D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 47(1), 283-291, janeiro, 2003. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/47/1/283.short>. Acesso em: 9 nov 2020.

FIELDS, S. Proteomics in genomeland. **Science**, 291(5507), 1221-1224, fevereiro, 2001. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/291/5507/1221.summary>. Acesso em: 9 nov 2020.

FONTAINE, M. C. *et al.* Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, 24(33-34), 5986-5996, agosto, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0600541X>. Acesso em: 9 nov 2020.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**, 76(1-2), 42-48, abril, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448807002866>. Acesso em: 9 nov 2020.

GARG, D. N.; CHANDIRAMANI, N. K. Cellular and humoral immune responses in sheep experimentally injected with killed and live *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, 260(1), 117-125, agosto,

1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176672485801073>. Acesso em: 9 nov 2020.

GENILLOUD, O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. **Current opinion in microbiology**, 51, 81-87, outubro, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527419300013>. Acesso em: 11 nov 2020.

GOMIDE, A. C. P. *et al.* Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi. **Gene**, 645, 124-130, março, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111917310685>. Acesso em 9 nov 2020.

GUEDES, M. T. *et al.* Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(8), 701-708, agosto, 2015. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2015000800701&script=sci_arttext. Acesso em: 9 nov 2020.

GUIMARÃES, A. S. *et al.* Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**, 2(2), 33-43, janeiro, 2011. Disponível em: [https://www.iioab.org/Vol2\(2\)2011/de%20Sa%20Guimaraes%20et%20al-IIOABJ-2%20\(2\)-2011-33-43p.pdf](https://www.iioab.org/Vol2(2)2011/de%20Sa%20Guimaraes%20et%20al-IIOABJ-2%20(2)-2011-33-43p.pdf). Acesso em: 9 nov 2020.

GUIMARÃES, A. S. *et al.* Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using ERIC-PCR. **Veterinary microbiology**, 153(3-4), 299-306, dezembro, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511003300>. Acesso em: 9 nov 2020.

GUIMARÃES, F. G. **Integração de dados de expressão gênica e proteômica em redes de interação proteína-proteína de *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (mestrado em ciências da saúde), Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19538>. Acesso em: 9 nov 2020.

HARD, G. C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. **Journal of medical microbiology**, 5(4), 483-491, 1972. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-5-4-483>. Acesso em: 9 nov 2020.

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infection and immunity**, 12(6), 1439-1449, 1975. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/12/6/1439.short>. Acesso em: 9 nov 2020.

HARVEY, K. L. *et al.* The diverse functional roles of elongation factor Tu (EF-Tu) in microbial pathogenesis. **Frontiers in microbiology**, 10, 2351, outubro, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02351/full>. Acesso em: 9 nov 2020.

HASSAN, S. S. *et al.* Proteome scale comparative modeling for conserved drug and vaccine targets identification in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC genomics**, 15(S7), S3, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2164-15-S7-S3>. Acesso em: 24 nov 2020.

HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, 3(2), 68-72, 2008. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012079800>. Acesso em: 10 nov 2020.

HEGGELUND, L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. **Open forum infectious diseases**, 2(2), 1-5. abril, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/ofid/article/2/2/ofv053/1412865>. Acesso em: 10 nov 2020.

HOFFMANN, A.; BUKAU, B.; KRAMER, G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1803(6), 650-661, junho, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910000303>. Acesso em: 10 nov 2020.

HOLANDA FILHO, Z. F. *et al.* Avaliação de impactos socioambientais do uso de boas práticas na produção de ovinos e caprinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, dezembro, 2019. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1117062>. Acesso em: 10 nov 2020.

HOU, X. G. *et al.* Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes. **Microbiology and immunology**, 41(6), 453-460, 1997. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01878.x>. Acesso em: 10 nov 2020.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2018**. 46, p. 1-8, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf. Acesso em 10 nov 2020.

IBRAIM, I. C. *et al.* Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. **BMC genomics**, 20(1), 663, agosto, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-019-6018-1>. Acesso em: 10 nov 2020.

IMLAY, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress?. **Environmental microbiology**, 21(2), 521-530, 2018. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.14445>. Acesso em: 10 dez 2020.

JENSEN, S. O.; REEVES, P. R. Molecular evolution of the GDP-mannose pathway genes (manB and manC) in *Salmonella enterica*. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AY012160–AY012201. **Microbiology**, 147(3), 599-610, março, 2001. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-3-599>. Acesso em: 10 nov 2020.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**, 29(1), 189-196, abril, 1966. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03467.x>. Acesso em: 10 nov 2020.

JUDSON, R.; SONGER, J. G. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. **Veterinary microbiology**, 27(2), 145-150, abril, 1991. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037811359190005Z>. Acesso em: 10 nov 2020.

KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G. F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Veterinary microbiology**, 78(2), 155-163, janeiro, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500002844>. Acesso em: 10 nov 2020.

KALIL, M. A. *et al.* Brazilian green propolis as a therapeutic agent for the post-surgical treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Frontiers in veterinary science**, 6(399), 1-10, novembro, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00399/full?report=reader>. Acesso em: 10 nov 2020.

KARIUKI, D. P.; POULTON, J. Corynebacterial infection of cattle in Kenya. **Tropical animal health and production**, 14(1), 33-36, fevereiro, 1982. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02281102>. Acesso em: 10 nov 2020.

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 69(4), 527-543, dezembro, 2005. Disponível em: <https://mmbr.asm.org/content/69/4/527.short>. Acesso em 10 nov 2020.

KELLY, E. J.; ROOD, K. A.; SKIRPSTUNAS, R. Abscesses in captive elk associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Utah, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, 48(3), 803-805, julho, 2012. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/48/3/803/121851/Abscesses-in-Captive-Elk-Associated-with>. Acesso em: 10 nov 2020.

KHAN, S. T. *et al.* Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Amb Express**, 7(1), 1-11, 2017. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-017-0344-y>. Acesso em: 11 dez 2020.

KRAMER, G. *et al.* Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, 279(14), 14165-14170, abril, 2004. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/279/14/14165.short>. Acesso em: 10 nov 2020.

KROMINA, K. A.; IGNATOV, A. N.; ABDEEVA, I. A. Role of peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerases in pathologic processes. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A:**

Membrane and Cell Biology, 2(3), 195-202, agosto, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S199074780803001X>. Acesso em: 10 nov 2020.

KUNERT, A. *et al.* Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. **The Journal of Immunology**, 179(5), 2979-2988, setembro, 2007. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/179/5/2979.short>. Acesso em: 10 nov 2020.

LAHTI, R. *et al.* Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. **Journal of bacteriology**, 170(12), 5901-5907, dezembro, 1988. Disponível em: <https://jb.asm.org/content/170/12/5901.short>. Acesso em: 10 nov 2020.

LEITE, N. M. *et al.* Linfangite ulcerativa em equino: relato de caso. **PUBVET**, 13(11), 150, 2019. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/6256/linfangite-ulcerativa-em-equino-relato-de-caso>. Acesso em: 11 nov 2020.

LIEBL, W. *Corynebacterium*–nonmedical. In: DWORKIN *et al.* **The prokaryotes**. 3 ed. Nova Iorque, EUA: Springer, 2006. Capítulo 1.1.15, p. 796-818. v. 3.

LOPEZ, J. F.; WONG, F. M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. First case of human infection. **American Journal of Clinical Pathology**, 46(5), 562-567. 1966. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/46/5/562/1769087>. Acesso em: 13 nov 2020.

LU, P.; LILL, H.; BALD, D. ATP synthase in mycobacteria: special features and implications for a function as drug target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1837(7), 1208-1218. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272814000322>. Acesso em: 13 nov 2020.

LUDWIG, W. *et al.* Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu: functional, structural and phylogenetic evaluations. **Archives of microbiology**, 153(3), 241-247. 1990. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00249075>. Acesso em: 13 nov 2020.

MARTINEZ, J. L.; DELGADO-IRIBARREN, A.; BAQUERO, F. Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. **FEMS Microbiology Letters**, 75(1), 45-56, março, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/037810979090522R>. Acesso em: 13 nov 2020.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, 153(7), 2203-2211, julho, 2007. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/005926-0?crawler=true>. Acesso em: 13 nov 2020.

MCNICHOLAS, P. M. *et al.* Expression of the heme biosynthetic pathway genes hemCD, hemH, hemM and hemA of *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, 146(1), 143-148,

1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/146/1/143/566612>. Acesso em: 11 dez 2020.

MENZIES, P. I. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an Escherichia coli recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Ruminant Research**, 13(2), 193-198. 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0921448894900965>. Acesso em: 13 nov 2020.

MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T.; PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary microbiology**, 100(1-2), 129-137, maio, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113504000483>. Acesso em: 13 nov 2020.

MERKAMM, M.; GUYONVARCH, A. Cloning of the sodA Gene from *Corynebacterium melassecola* and Role of Superoxide Dismutase in Cellular Viability. **Journal of bacteriology**, 183(4), 1284-1295. 2001. Disponível em: <https://jb.asm.org/content/183/4/1284.short>. Acesso em: 13 nov 2020.

MISHRA, A. K. *et al.* Deletion of manC in *Corynebacterium glutamicum* results in a phospho-myo-inositol mannoside-and lipoglycan-deficient mutant. **Microbiology**, 158(7), 1908-1917, julho, 2012. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.057653-0>. Acesso em: 13 nov 2020.

MOHAMED, S. R.; REDA, L. M. Oedematous skin Disease in Buffaloes and Cows. **The Egyptian Journal of Veterinary Science**, 46(1), 1-10. 2015. Disponível em: https://ejvs.journals.ekb.eg/article_740.html. Acesso em: 13 nov 2020.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, 46(2), 206-208, abril, 1982. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1320282/>. Acesso em: 15 nov 2020.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Australian veterinary journal**, 50(12), 537-542, dezembro, 1974. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1974.tb14072.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

OH, T. J. *et al.* NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in Escherichia coli K-12 through the action of oxaloacetate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11(1), 9-14, janeiro, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138266890100093X>. Acesso em: 15 nov 2020.

PACHECO, L. G. *et al.* Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, 56(4), 480-486, abril, 2007. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46997-0>. Acesso em: 15 nov 2020.

PACHECO, L. G., *et al.* A role for sigma factor σ^E in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxide stress. **Frontiers in microbiology**, 3, 126, abril, 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00126/full>. Acesso em: 15 nov 2020.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405 (6788), 837-846, junho, 2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35015709>. Acesso em: 15 nov 2020.

PATON, M. W. *et al.* New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Australian Veterinary Journal**, 71(2), 47-49, fevereiro, 1994. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1994.tb06152.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

PATON, M. W. *et al.* Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian veterinary journal**, 81(1-2), 91-95, janeiro, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11443.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, 25(13), 1605-1612, outubro, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.20084>. Acesso em: 15 nov 2020.

PINTO, A. C. *et al.* Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. **BMC genomics**, 15(1), 1-14, janeiro, 2014. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-14>. Acesso em: 15 nov 2020.

POONACHA, K. B.; DONAHUE, J. M. Abortion in a mare associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 7(4), 563-564, 1995. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/104063879500700428>. Acesso em: 15 nov 2020.

PRESCOTT, J. F.; MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary microbiology**, 88(3), 287-297, setembro, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502001219>. Acesso em: 15 nov 2020.

PUECH, V. *et al.* Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. **Microbiology**, 147(5), 1365-1382, maio, 2001. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-5-1365>. Acesso em: 15 nov 2020.

PURCHASE, H. S. An outbreak of ulcerative lymphangitis in cattle caused by *Corynebacterium ovis*. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, 54, 238-244, 1944. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S036817424480025X>. Acesso em: 15 nov 2020.

RADUSKY, L. G., *et al.* An integrated structural proteomics approach along the druggable genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* species for putative druggable targets. **BMC genomics**, 16(5), 1-8, 2015. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-16-S5-S9>. Acesso em: 18 nov 2020.

REDDY, G. K.; WENDISCH, V. F. Characterization of 3-phosphoglycerate kinase from *Corynebacterium glutamicum* and its impact on amino acid production. **BMC microbiology**, 14(1), 54, março, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-14-54>. Acesso em: 15 nov 2020.

RIBEIRO, M. G. *et al.* Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arq. Inst. Biol.**, 68 (1), 23-28, 2001.

RIBEIRO, D. *et al.* An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary research**, 45(1), 1-6, março, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1297-9716-45-28>. Acesso em: 15 nov 2020.

SAKHARKAR, K. R.; SAKHARKAR, M. K.; CHOW, V. T. Biocomputational strategies for microbial drug target identification. In: CHAMPNEY, W. S. New antibiotic targets. **Methods in Molecular Medicine**, Humana Press, 142, 2008. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-246-5_1. Acesso em: 15 nov 2020.

SAMLAND, A. K. *et al.* Conservation of structure and mechanism within the transaldolase enzyme family. **The FEBS journal**, 279(5), 766-778, março, 2012. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2011.08467.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

SANTANA, M. P. **Análise transcricional de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi, linhagem 258, a partir de montagem ab initio: um enfoque nos processos biológicos dos estimulons ácido, térmico e osmótico.** 2014. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-9NMHUR>. Acesso em: 15 nov 2020.

SANTIAGO, L. B. *et al.* Avaliação in vivo de antissépticos e desinfetantes no controle da Linfadenite Caseosa: acompanhamento clínico, hematológico, sorológico e microbiológico. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80(3), 273-280, 2013. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180816572013000300003&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 15 nov 2020.

SANTOS, L. M. *et al.* Biogenic silver nanoparticles as a post-surgical treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminants. **Frontiers in**

microbiology, 10, 824, abril, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00824/full>. Acesso em: 15 nov 2020.

SELIM, S. A. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine**, 48(4), 241-258, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0450.2001.00451.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary record**, 159(7), 216-217, agosto, 2006.

SEYFFERT, N. *et al.* High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in veterinary science**, 88(1), 50-55, fevereiro, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528809001581>. Acesso em: 15 nov 2020.

SHENDE, G. *et al.* PBIT: Pipeline Builder for Identification of drug Targets for infectious diseases. **Bioinformatics**, 33(6), 929-931, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/33/6/929/2761473>. Acesso em: 23 nov 2020.

SHIGIDI, M. T. A. An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of *C. ovis* infection in sheep. **Research in veterinary science**, 24(1), 57-60, janeiro, 1978. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528818330984>. Acesso em: 15 nov 2020.

SHIGIDI, M. T. A. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **British veterinary journal**, 135(2), 172-177, 1979. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000719351732938X>. Acesso em 15 nov 2020.

SILVA, A. *et al.* Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. **Journal of bacteriology**, 193(1), 323-324, janeiro, 2011. Disponível em: <https://jb.asm.org/content/193/1/323.short>. Acesso em: 15 nov 2020.

SILVA, W. M. *et al.* Label-free quantitative proteomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between Biovars ovis and equi strains. **BMC genomics**, 18, 451, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-017-3835-y>. Acesso em: 15 nov 2020.

SILVA, W. M. *et al.* A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. **BMC microbiology**, 17, 55, 1-14, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12866-017-0925-6>. Acesso em: 15 nov 2020.

SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. L.; STRUGNELL, R. A. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and immunity**, 65(8), 3048-3056, agosto, 1997. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/65/8/3048.short>. Acesso em: 15 nov 2020.

SLAUCH, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. **Molecular microbiology**, 80(3), 580-583, maio, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

SOARES, S. C. *et al.* The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. **PLoS One**, 8(1), janeiro, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053818>. Acesso em: 15 nov 2020.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in microbiology**, 5(4), 156-161, abril, 1997. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(97\)01005-6.pdf](https://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(97)01005-6.pdf). Acesso em: 15 nov 2020.

SOUZA, A. D. S. *et al.* Ocorrência de cicatrizes e abscessos causados pela Linfadenite caseosa em caprinos do rebanho da Embrapa Semiárido. In: Embrapa Semiárido - Artigo em anais de congresso (ALICE), 2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1013685>. Acesso em: 15 nov 2020.

SPIER, S. J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: An emerging disease associated with climate change?. **Equine Veterinary Education**, 20(1), pg 37-39, janeiro, 2008. Disponível em: <https://aaep.org/sites/default/files/issues/eve-20-1-Spier EVE 20-1.pdf>. Acesso em: 15 nov 2020.

STEERFORTH, D.; MARUTSOV, P. Ulcerative lymphangitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Bulgarian Holstein dairy cows. **Veterinary Record Case Reports**, 5(4), 2017. Disponível em: https://vetrecordcasereports.bmj.com/content/5/4/e000454?cpetoc=&utm_source=trendmd&utm_medium=cpc&utm_campaign=usage&utm_content=012020&utm_term=consumer. Acesso em: 15 nov 2020.

STEFANSKA, I. *et al.* Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, 13(1), 143-149, 2010.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15–ligand discovery for everyone. **Journal of chemical information and modeling**, 55(11), 2324-2337, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.5b00559>. Acesso em: 15 nov 2020.

SUTHERLAND, S. S. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Australian Veterinary Journal**, 64(9), 263-266, setembro, 1987. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1987.tb15953.x>. Acesso em: 15 nov 2020.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. **Veterinary microbiology**, 49(1-2), 1-9, março, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113595001468>. Acesso em: 15 nov 2020.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, 43(1), 447-452, janeiro, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D447/2435295>. Acesso em: 15 nov 2020.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic acids research**, 47(D1), D607-D613, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D607/5198476>. Acesso em: 23 nov 2020.

THOMAS, S. D.; JORDAN, P. M. Nucleotide sequence of the hemC locus encoding porphobilinogen deaminase of *Escherichia coli* K12. **Nucleic acids research**, 14(15), 6215-6226, agosto, 1986. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/14/15/6215/1164965>. Acesso em: 15 nov 2020.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, 49(11), 3315-3321, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm051197e>. Acesso em: 15 nov 2020.

TOUATI, D. Iron and oxidative stress in bacteria. **Archives of biochemistry and biophysics**, 373(1), 1-6, janeiro, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986199915187>. Acesso em: 15 nov 2020.

TRANT, C. G. *et al.* The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. **Infection and immunity**, 78(5), 2283-2291, maio, 2010. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/78/5/2283.short>. Acesso em: 15 nov 2020.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, 31(2), 455-461, janeiro, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21334>. Acesso em: 18 nov 2020.

UNANIAN, M. M.; SILVA, A. F.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. **Tropical animal health and production**, 17(1), 57-62, 1985. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02356137>. Acesso em: 16 nov 2020.

VAN DAM, S. *et al.* Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions. **Briefings in bioinformatics**, 19(4), 575-592, julho, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/bib/article/19/4/575/2888441>. Acesso em: 16 nov 2020.

VATANAIBOON, P. *et al.* Transaldolase exhibits a protective role against menadione toxicity in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Biochemical and biophysical research communications**, 297(4), 968-973, outubro, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X0202329X>. Acesso em: 16 nov 2020.

VIEIRA, M. M. M. *et al.* Aspectos fisiológicos e bioclimáticos de caprinos nas regiões semiáridas. **PUBVET**, 10(5), 356-447, 2016. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/2751/aspectos-fisioloacutegicos-e-bioclimaacuteticos-de-caprinos-nas-regiotildees-semiaacuteridas>. Acesso em: 16 nov 2020.

VISICK, J. E.; CLARKE, S. Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. **Molecular microbiology**, 16(5), 835-845, junho, 1995. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02311.x>. Acesso em: 16 nov 2020.

WASHBURN, K. E. *et al.* Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Journal of the american veterinary medical association**, 234(9), 1162-1166, maio, 2009. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.234.9.1162>. Acesso em: 16 nov 2020.

WILKINS, J. C.; HOMER, K. A.; BEIGHTON, D. Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. **Applied and environmental microbiology**, 68(5), 2382-2390, maio, 2002. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/68/5/2382.short>. Acesso em: 16 nov 2020.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary clinics of North America: Food animal practice**, 17(2), 359-371, julho, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749072015300335>. Acesso em: 16 nov 2020.

WINDSOR, P. A. Control of caseous lymphadenitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 27(1), 193-202, março, 2011. Disponível em: [https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(10\)00096-4/abstract](https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(10)00096-4/abstract). Acesso em: 16 nov 2020.

WU, C. H. *et al.* Identification and subcellular localization of a novel Cu, Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS letters**, 439(1-2), 192-196, novembro, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579398013738>. Acesso em: 16 nov 2020.

WU, D. *et al.* D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. **International journal of antimicrobial agents**, 32(5), 421-426, novembro, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857908002720>. Acesso em: 16 nov 2020.

WU, J. *et al.* Polynucleotide phosphorylase protects *Escherichia coli* against oxidative stress. **Biochemistry**, 48(9), 2012-2020, 2009. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi801752p>. Acesso em: 16 nov 2020.

WU, T. *et al.* Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence. **Microbial pathogenesis**, 51(1-2), 69-76, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401010001798>. Acesso em: 16 nov 2020.

YERUHAM, I. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. **Veterinary Record**, 140(16), 423-427, 1997. Disponível em: <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/140/16/423.short>. Acesso em: 16 nov 2020.

ZHANG, L. *et al.* A proline iminopeptidase gene upregulated in planta by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular microbiology**, 65(1), 121-136, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Sumário das interações.

Proteínas (genes)	Interações
<i>atpA - mdh</i>	Coexpressão; experimento; mineração textual; vizinhança gênica
<i>atpA - pgk</i>	Coexpressão; experimento; mineração textual; vizinhança gênica
<i>atpA - ppa</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>atpA - tig</i>	Coexpressão; mineração textual
<i>atpA - tuf</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>groEL - pgk</i>	Coexpressão; co-ocorrência; experimento; mineração textual
<i>groEL - sodA</i>	Coexpressão; experimento; mineração textual; vizinhança gênica
<i>groEL - tig</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>groEL - tuf</i>	Coexpressão; co-ocorrência; experimento; mineração textual
<i>pgk - mdh</i>	Coexpressão; experimento; mineração textual; vizinhança gênica
<i>pgk - sodA</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>pgk - tal</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>pgk - tig</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>pgk - tuf</i>	Coexpressão; co-ocorrência; mineração textual
<i>pnp - tuf</i>	Coexpressão; mineração textual
<i>ppa - tal</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica
<i>ppa - tig</i>	Coexpressão; experimento; mineração textual
<i>ppa - tuf</i>	Coexpressão; experimento; mineração textual
<i>sodA - pnp</i>	Coexpressão; co-ocorrência; mineração textual; vizinhança gênica;
<i>sodA - tuf</i>	Coexpressão; mineração textual
<i>tig - tuf</i>	Coexpressão; mineração textual; vizinhança gênica

APÊNDICE B - Melhores compostos encontrados para Ddl e Ppa

Proteína alvo	ZINC ID	Afinidade	Ligações de Hidrogênio	Resíduos
Ddl	ZINC04235909	-8.5	2	GLN23, TRP59
	ZINC04235916	-8.7	2	SER197, THR289
	ZINC04235924	-10	3	SER24, SER25, ARG118
	ZINC04258871	-8.7	2	GLN287, GLN302
	ZINC04270543	-9.0	2	GLN287, GLN302
	ZINC06131115	-8.9	2	GLN23, ARG118
	ZINC15709482	-8.9	2	SER143
Ppa	ZINC03839976	-8.0	3	HIS21, ARG30, LYS126
	ZINC03839994	-8.1	3	HIS21, ARG30, LYS126
	ZINC03839996	-9.3	2	HIS21
	ZINC04222214	-7.4	1	ASP27
	ZINC04222225	-7.0	2	LYS16, TYR42
	ZINC04235924	-8.9	2	ARG30, LYS126
	ZINC04259070	-9.6	2	HIS21
	ZINC04260398	-8.0	3	HIS21, ARG30, LYS126
	ZINC15709489	-8.4	3	ARG30, TYR42, LYS126

*Compostos que não apresentaram ligações de hidrogênio com a proteína alvo foram desconsiderados.