

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Bibiana Petri da Silveira

**HOMEOSTASIA DO FERRO EM *Rhodococcus equi*:
NOVAS PERSPECTIVAS A PARTIR DO PERFIL DE EXPRESSÃO
GÊNICA DE GAPDH E *RHEQUICHELIN***

Santa Maria, RS
2018

Bibiana Petri da Silveira

HOMEOSTASIA DO FERRO EM *Rhodococcus equi*: NOVAS PERSPECTIVAS A PARTIR DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE GAPDH E *RHEQUICHELIN*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Agueda Castagna de Vargas

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª. Letícia Trevisan Gressler

Santa Maria, RS
2018

Silveira, Bibiana Petri

Homeostasia do ferro em *Rhodococcus equi*: novas perspectivas a partir do perfil de expressão gênica de GAPDH e rhequichelin / Bibiana Petri Silveira.- 2018.
54 p.; 30 cm

Orientadora: Agueda Castagna de Vargas

Coorientadora: Letícia Trevisan Gressler

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. Rodococose 2. Aquisição de Ferro 3. Expressão gênica 4. Bactéria 5. *Rhodococcus equi* I. Vargas, Agueda Castagna de II. Gressler, Letícia Trevisan III. Título.

Bibiana Petri da Silveira

HOMEOSTASIA DO FERRO EM *Rhodococcus equi*: NOVAS PERSPECTIVAS A PARTIR DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE GAPDH E *RHEQUICHELIN*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 18 de dezembro de 2018:



Agueda Castagna de Vargas, Dra. (UFSM)
Presidente/Orientador



Angela Ilha Bordin, PhD. (TAMU)



Juliana Felipetto Cargnelutti, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades de estudo e sua excelência, essenciais para minha formação pessoal e profissional. Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de cursar o mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria por disponibilizar a estrutura para a realização de estágio, iniciação científica e experimentos.

À minha orientadora, professora Agueda Castagna de Vargas, pela confiança e ensinamentos.

À minha mentora coorientadora neste trabalho, Letícia Trevisan Gressler, por todos os ensinamentos (sejam eles bacterianos, de pesquisa ou da vida), por acreditar em mim, por todo tempo investido na minha formação e por ser, acima de tudo, humana. Tens grande parte do mérito pelo meu trabalho, és minha inspiração.

A toda equipe do LABAC, aos colegas atuais e aos antigos, pelo auxílio nos experimentos e rotina e pelo conhecimento repassado.

Ao Setor de Virologia da UFSM, especialmente a Juliana Cargnelutti, agradeço pelo apoio técnico e estrutural na realização da qPCR.

À minha família pelo suporte emocional e por ter entendido minhas ausências. Em especial a minha mãe, por me dar a oportunidade de crescer tão perto da área acadêmica e sempre me incentivar a segui-la.

Ao meu companheiro, Dimas, pelo apoio incondicional nessa jornada e em tantas outras. Por todo carinho e companheirismo, é muito bom poder compartilhar a vida contigo.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, o meu muito obrigada!

RESUMO

HOMEOSTASIA DO FERRO EM *Rhodococcus equi*: NOVAS PERSPECTIVAS A PARTIR DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE GAPDH E *RHEQUICHELIN*

AUTORA: Bibiana Petri da Silveira

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Agueda Castagna de Vargas

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Letícia Trevisan Gressler

A rodococose equina manifesta-se principalmente através da ocorrência de pneumonia em potros, representando um grande desafio para a criação de equinos no Brasil e no mundo. Seu agente etiológico é uma bactéria intracelular facultativa, denominada *Rhodococcus equi*, cuja patogenicidade está associada à capacidade de replicar no interior de macrófagos. Os genes *vapA* e *rhbC* são necessários para sobrevivência intracelular de *R. equi*, uma vez que codificam a proteína associada à virulência A (VapA) e o sideróforo *rhequichelin*, respectivamente. A homeostasia do ferro (Fe) é regulada com precisão pelos micro-organismos, pois sua restrição limita a replicação destes, enquanto o excesso pode ser tóxico. *R. equi* é capaz de adquirir Fe através da transferrina (Tf), porém o mecanismo responsável por esta interação ainda não está elucidado. A aquisição de Fe ligado à Tf através da proteína *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) foi recentemente descrita em *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno intracelular similar ao *R. equi*. Em células eucarióticas, a GAPDH atua tanto na aquisição quando no efluxo de Fe. Nesse contexto, torna-se importante entender os mecanismos envolvidos na homeostasia do Fe por *R. equi* e buscar por alternativas terapêuticas e profiláticas com potencial para modular a imunidade nutricional. A presente dissertação descreve as alterações no crescimento bacteriano e na expressão dos genes GAPDH, *rhbC* e *vapA* em *R. equi* cultivado em diferentes concentrações de Fe, bem como na presença de apo-Tf (Tf insaturada) e holo-Tf (Tf saturada). Os cultivos bacterianos foram realizados em meio mínimo com lactato (controle) e suas variações (excesso de Fe, restrição de Fe e suplementação com apo-Tf e holo-Tf). O crescimento bacteriano foi avaliado através da contagem de unidades formadoras de colônias após 24 e 48 horas de incubação. Após o crescimento bacteriano foi realizada o isolamento do RNA e a síntese do cDNA, que posteriormente foi quantificado através da reação da cadeia polimerase em tempo real (PCR-RT). Em restrição de Fe observou-se a redução das taxas de crescimento de *R. equi*, onde em níveis extremos observou-se a sua morte. A taxa de transcrição dos genes GAPDH, *vapA* e *rhbC* elevaram-se em ambiente de restrição de Fe, quando comparadas ao controle. Todavia, para *rhbC* esta elevação é observada apenas em níveis críticos de restrição. Por outro lado, *rhbC* e *vapA* também aumentaram sua expressão em meio com excesso de Fe. Com base nestes resultados, acreditamos que além da função na aquisição de Fe, o sideróforo *rhequichelin* possivelmente desempenhe um papel antioxidante em *R. equi*, promovendo o sequestro deste micronutriente quando em excesso. Os resultados obtidos indicam que GAPDH participa da homeostasia de Fe em *R. equi*, possivelmente de forma similar a sua atuação em *Mycobacterium tuberculosis*. Futuros estudos são necessários a fim de elucidar os mecanismos pelos quais GAPDH e *rhequichelin* atuam na homeostasia do Fe e na sobrevivência intracelular de *R. equi*. É importante ressaltar que esses mecanismos podem representar potenciais alvos terapêuticos e de prevenção da rodococose em equinos jovens.

Palavras-chave: Aquisição de ferro, bactéria, estresse oxidativo, infecção, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *rhbC*, pneumonia, sideróforo, *vapA*.

ABSTRACT

***Rhodococcus equi* IRON HOMEOSTASIS: NEW INSIGHTS ON GENE EXPRESSION PROFILE OF GAPDH AND RHEQUICHELIN**

AUTHOR: Bibiana Petri da Silveira
ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Agueda Castagna de Vargas
CO-ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Letícia Trevisan Gressler

Pneumonia in foals is the main clinical manifestation of equine rhodococcosis, and represents an important challenge in equine production in Brazil and world-wide. The etiologic agent is an intracellular facultative bacterium, named *Rhodococcus equi*. Its pathogenicity is associated to its ability to replicate inside macrophages. The genes *vapA* e *rhbC*, which encode virulence associated protein A (VapA) and the siderophore rhequichelin, respectively, are required for intracellular survival of *R. equi*. Iron (Fe) homeostasis is precisely regulated by microorganisms: its restriction limits cell replication, and its excess might be toxic. *R. equi* acquires Fe from holo-transferrin, however, the mechanisms involved are unknown. The acquisition of Fe bound to Tf by the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was described on *Mycobacterium tuberculosis*, a pathogen similar to *R. equi*. In eukaryotic cells, GAPDH has a role in both up-take and efflux of Fe. It is important to understand the mechanisms involved in *R. equi* Fe homeostasis in order to develop therapeutic and prophylactic alternatives with potential to modulate nutritional immunity. The present dissertation describes the changes in bacterial growth rates and in gene expression of GAPDH, *rhbC* and *vapA* in *R. equi* cultures under different concentration of Fe as well as presence or absence of apo-Tf (unsaturated-Tf) and holo-Tf (saturated-Tf). Quantitative culture of *R. equi* was performed in lactate minimal media (control) e its variations (Fe excess, Fe deprivation, and apo-Tf and holo-Tf supplementation). Bacterial growth rates were measured at 24 and 48 hours post-incubation, by counting the number of colony-forming units. The RNA was isolated from the bacterial culture and the cDNA synthesized for latter quantification by real-time polymerase chain reaction (PCR-RT). Under Fe deprivation, there were a decrease in *R. equi* growth rates and in the critical level bacterial death were observed. It was found that GAPDH, *rhbC* and *vapA* transcription increase in a Fe deprived environment, however, the *rhbC* gene expression increase was observed only in critical levels of Fe starvation. Conversely, *rhbC* and *vapA* were also up regulated in media with Fe excess. Based on these results, we believe that in addition to the role in the Fe acquisition, rhequichelin might have an antioxidant role in *R. equi* by sequestration of this micronutrient in excessive concentration. The results indicate that GAPDH participate on Fe homeostasis in *R. equi*, possibly with similar function as observed in *Mycobacterium tuberculosis* in which the GAPDH expression increased in Fe-depleted environment, indicating a possible role *R. equi* Fe acquisition. Further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in GAPDH and rhequichelin functions in Fe homeostasis and in intracellular survival of *R. equi*. It is important to highlight that these mechanisms might be potential targets for rhodococcosis prevention and therapy in young foals.

Keywords: Bacteria, infection, iron acquisition, oxidative stress, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pneumonia, *rhbC*, siderophore, *vapA*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC[®]: American Type Culture Collection
- bATf: apo-transferrina bovina
- bHTf: holo-transferrina bovina
- cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DNase: desoxirribonuclease
- DIP: 2.2'-*bipyridyl*
- E: eficiência da amplificação
- EUA/USA: Estados Unidos da América
- F: *forward*
- Fe: ferro/*iron*
- GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- LABAC: Laboratório de Bacteriologia
- Lf: lactoferrina
- LMM: meio mínimo com lactato
- LMM-Fe: meio mínimo com lactato sem adição de ferro (restrição leve)
- LMM-Fe+FeCl₃: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 75 µM de cloreto férrico.
- LMM-Fe+bATf: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 5 µM de apo-transferrina bovina.
- LMM-Fe+bHTf: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 5 µM de holo-transferrina bovina.
- LMM-Fe+DIP50: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 50 µM de 2.2'-*bipyridyl*
- LMM-Fe+DIP100: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 100 µM de 2.2'-*bipyridyl*
- LMM-Fe+DIP150: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 150 µM de 2.2'-*bipyridyl*
- LMM-Fe+DIP200: meio mínimo com lactato, sem adição de ferro, suplementado com 200 µM de 2.2'-*bipyridyl*
- LMM+bATf: meio mínimo com lactato suplementado com 5 µM de apo-transferrina bovina.
- LMM+bHTf: meio mínimo com lactato suplementado com 5 µM de holo-transferrina bovina.
- ml: mililitro
- min: minuto (s)
- mM: miliMolar / miliMol
- P: probabilidade de significância
- PCA: plate count agar (agar de contagem em placa)
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- pH: potencial hidrogeniônico
- R: *reverse*
- R. equi: Rhodococcus equi*

rhbABCDE: grupo de genes que codifica o sideróforo *rhequichelin*

RQ: quantificação relativa

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa

SEM: Standard Error of the Mean

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RS: Rio Grande do Sul

RT: *transcriptase reversa*

Tf: transferrina/*transferrin*

UFC/CFU: unidades formadoras de colônia

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria

vapA: gene que codifica proteína associada à virulência A

VapA: proteína associada à virulência A

μM: micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

±: mais ou menos

<: menor

®: marca registrada

™: trade mark (marca registrada)

%: por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 RODOCOCOSE EQUINA	10
2.2 <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> : PATÓGENO INTRACELULAR COM VIRULÊNCIA ASSOCIADA À CAPTAÇÃO DE FERRO.....	12
2.3 SIDERÓFOROS IDENTIFICADOS EM <i>R. EQUI</i>	13
2.4 IMPORTÂNCIA DA TRANSFERRINA E DA DISPONIBILIDADE DE FERRO DURANTE A INFECÇÃO POR <i>RHODOCOCCUS EQUI</i>	14
2.5 <i>GLYCERALDEHYDE – 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE</i> (GAPDH) E SUA AÇÃO NA HOMEOSTASIA DO FERRO	16
3. ARTIGO: <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> IRON HOMEOSTASIS BY GAPDH AND RHEQUICHELIN	19
4. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE A - CURVAS PADRÃO DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA QPCR (<i>GYRB</i>, GAPDH, <i>VAPA</i> E <i>RHBC</i>).	52
APÊNDICE B – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA OBTIDO EM CADA UM DOS TRÊS ENSAIOS BIOLÓGICOS (A, B E C) EM DUPLICATA DA TÉCNICA.....	53
APÊNDICE C – GRÁFICOS DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE GAPDH, <i>RHBC</i> E <i>VAPA</i>	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente oito milhões de equinos, muares e asininos (FAO, 2014), sendo este o maior rebanho equídeo da América Latina e o quarto mundial. A produção brasileira de equinos movimentou R\$ 7,3 bilhões em 2016 (MAPA, 2016), contribuindo para geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (ESALQ, 2016). No cenário internacional, o Brasil cresceu mais de 500% entre 1997 a 2009, nos quais foram movimentados 702 milhões de dólares na exportação de equinos vivos (MAPA, 2016). O Rio Grande do Sul (RS) é o segundo estado Brasileiro em número de equinos, totalizando 535.227, as quais respondem por 55% do total de equinos da região Sul do país (IBGE, 2015).

Na região Sul, a criação de equinos com alto padrão zootécnico vem elevando as perspectivas de crescimento e desenvolvimento do setor. A cidade de Bagé (RS) abriga cerca de 50% da criação de equinos da raça Puro Sangue Inglês, o que despertou a criação de um projeto de lei a fim de conferir a esta cidade o título de “Capital Nacional da Criação de Cavalos da Raça Puro Sangue Inglês” (HAMM, AFONSO PL 7126/2017). Da mesma forma que em outras criações animais, garantir a manutenção da sanidade destes rebanhos é fundamental para o sucesso da produção e o bem-estar dos equinos. Na equideocultura, as principais perdas econômicas estão associadas aos custos com atendimento médico veterinário, medicamentos, mortalidade dos animais, muitas vezes de elevado valor individual, e complicações secundárias que podem encerrar prematuramente a vida produtiva, especialmente quando a finalidade é competir em eventos equestres (AINSWORTH et al., 1997; VENNER et al., 2012).

Atualmente, o controle e prevenção de enfermidades do trato respiratório representam um dos maiores desafios da produção intensificada de equinos, destacando-se a adenite e anemia infecciosa em animais adultos, e rodococose em animais jovens. A rodococose gera expressivo prejuízo econômico, principalmente devido ao elevado custo do tratamento, muitas vezes ineficiente e elevadas taxas de morbidade e mortalidade em locais endêmicos. Diante da inexistência de uma vacina disponível comercialmente no Brasil, o controle e prevenção desta enfermidade permanecem, ainda, dependentes de medidas específicas de manejo, quimioprofilaxia e tratamento dos animais doentes. Neste sentido, o presente estudo busca determinar possíveis alvos para medidas futuras de controle e prevenção da infecção por *R. equi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RODOCOCOSE EQUINA

A ocorrência de pneumonia em potros causada por *Rhodococcus equi* representa um grande desafio para a criação de equinos no mundo e no Brasil. A rodococose equina é considerada a principal causa de mortalidade em equinos com até seis meses de idade (RIBEIRO et al., 2005; GIGUÈRE et al., 2011), os quais são particularmente susceptíveis à infecção e desenvolvem broncopneumonia crônica, com formação de piogranulomas (PRESCOTT, 1991). Outras manifestações clínicas podem ser observadas, como enterocolite ulcerativa, linfadenite mesentérica, artrite purulenta, uveíte e linfangite (PRESCOTT et al., 2010). Tanto as manifestações associadas ao trato respiratório quanto às extra pulmonares atuam como importante causa de doença e morte em potros (COHEN, 2014). Além disso, *R. equi* é capaz de infectar outros mamíferos, sendo considerado um patógeno oportunista em humanos e, portanto, um agente zoonótico (PRESCOTT, 1991). Sua principal manifestação clínica em humanos assemelha-se à tuberculose, afetando principalmente pessoas imunocomprometidas como pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana, transplantados e indivíduos em tratamento contra o câncer (PRESCOTT, 1991; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2013; VECHI et al., 2018). Embora raros, têm sido observados casos de infecção por *R. equi* em humanos imunocompetentes, onde lesões localizadas representam 50% dos casos (CUI et al., 2018; HARVEY & SUNSTRUM, 1991; KEDLAYA, ING & WONG, 2001; TOOTSI, TAMM & LAISAAR, 2018).

Fatores ambientais, elevada densidade animal e concentração de *R. equi* virulento no ar, estão relacionados com a maior ocorrência da doença (COHEN, 2014), que pode ser classificada como endêmica, esporádica ou ausente (PRESCOTT, 1991). Em fazendas endêmicas para rodococose equina recomenda-se avaliação clínica e realização de ultrassonografia torácica de potros até duas vezes por semana, visando à identificação precoce da enfermidade. A apresentação subclínica da rodococose tem sido observada na maioria dos animais cuja tria-

gem periódica a partir de ultrassonografia torácica é realizada, no entanto sua importância ainda não foi esclarecida (HUBER et al., 2018b; SLOVIS et al., 2005; VENNER et al. 2007).

O tratamento no estágio inicial, logo que surgem os primeiros sinais clínicos, é fundamental para o sucesso da terapia. O protocolo terapêutico preconizado baseia-se na combinação de antimicrobianos da classe dos macrolídeos e rifampicina, sendo este utilizado desde a década de 1980 (GIGUÈRE et al., 2011). O custo do tratamento é elevado, com duração média de 3 a 12 semanas, dependendo da lesão inicial e da resposta do animal à terapia (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2013). A combinação de antimicrobianos atua de forma sinérgica e visa minimizar a ocorrência de cepas de *R. equi* resistentes aos antimicrobianos administrados (GIGUÈRE et al., 2012). Normalmente, cepas de *R. equi* isoladas de potros apresentam um perfil de sensibilidade aos macrolídeos e à rifampicina, no entanto, cepas de susceptibilidade intermediária e resistentes aos antimicrobianos de ambas as classes têm sido reportadas (GIGUÈRE, BERGHAUS, WILLINGHAM-LANE, 2017; GRESSLER et al., 2015; HUBER et al., 2018a). Estes achados contribuem para a crescente preocupação devido à ausência de alternativas terapêuticas e preventivas eficazes contra a infecção por *R. equi* (ANASTASI et al., 2015; COHEN, 2014).

Não existe uma vacina disponível comercialmente no Brasil para prevenir casos de pneumonia por *R. equi*. Os modelos vacinais reportados, de vacinas vivas, inativadas e atenuadas, bem como vacinas produzidas a partir de métodos moleculares modernos (vacinas de DNA plasmidial, atenuadas geneticamente e de subunidades) não promoveram proteção adequada à rodococose equina (GILES et al., 2015). Os mecanismos de resistência do hospedeiro frente à infecção por *R. equi* são complexos e envolvem tanto mecanismos da imunidade inata quanto adquirida. Embora a imunidade celular seja tradicionalmente considerada mais importante para proteção contra patógenos intracelulares, em *R. equi* a imunidade celular demonstrou não ser suficiente para proteção, onde a imunidade humoral também desempenha um papel importante. Recentemente, Cywes-Bentley e colaboradores (2018) produziram uma vacina, com o polissacarídeo de superfície PNAG (poli-N-acetil glucosamina), administrada em éguas durante o período pré-parto promovendo a proteção dos potros através da transferência de anticorpos pelo colostro. Outra alternativa utilizada para prevenção da rodococose é a administração endovenosa de plasma hiperimune que promove a redução na incidência e a

redução da severidade da doença, porém pode apresentar riscos aos animais, como reações transfusionais, hepatite associada à transfusão e lesões devido ao manejo dos animais (COHEN, 2014; CYWES-BENTLEY et al., 2018; SANZ et al., 2016).

2.2 *Rhodococcus equi*: PATÓGENO INTRACELULAR COM VIRULÊNCIA ASSOCIADA À CAPTAÇÃO DE FERRO

Rhodococcus equi pertence à ordem *Actinomycetales* e apresenta duas formas de vida: a forma saprófita, como ubíquo no solo e ambiente; e a forma patogênica, onde preferencialmente parasita macrófagos (PRESCOTT, 1991). A habilidade de *R. equi* replicar intracelularmente e resistir à morte por fagócitos está associada à presença de um grande plasmídeo, o qual abriga uma ilha de patogenicidade (VapACDEFGHI) composta por uma família de proteínas de superfície e secretadas, associadas à virulência (TAKAI et al., 2000; COULSON, AGARWAL & HONDALUS, 2010). A presença deste plasmídeo permite a sobrevivência e replicação intracelular de *R. equi* através da prevenção da fusão entre fagossomo e lisossomo (JAIN, BLOOM & HONDALUS, 2003; TOYOOKA, TAKAI & KIRIKAE, 2005; VON BARGEN et al., 2009, 2018). Dentre estas proteínas está a VapA (*Virulence Associated Protein A*), a qual foi encontrada em todos os isolados oriundos de infecções em potros e é considerada determinante, mas não suficiente para a infecção em potros (COULSON, AGARWAL & HONDALUS, 2010; GIGUÈRE et al., 1999; TAKAI et al., 1991). Recentemente, a principal função de VapA foi elucidada, sendo demonstrada a atuação da proteína na exclusão da bomba de prótons do complexo vacuolar do fagossomo, promovendo a permeabilização da membrana a fim de manter o pH neutro, resultando em um ambiente compatível com a manutenção da multiplicação intracelular de *R. equi* (VON BARGEN et al., 2018). Adicionalmente, *vapA* tem sua expressão gênica aumentada em ambiente com reduzida disponibilidade de ferro (Fe), como encontrado no interior de macrófagos (BENOIT et al., 2002; REN & PRESCOTT, 2003).

Para sobrevivência e multiplicação bacteriana no interior de macrófagos são necessários mecanismos de aquisição de Fe, pois as concentrações desse micronutriente essencial, em sua forma livre, são praticamente indetectáveis e, portanto, insuficientes para a replicação

bacteriana (PASSALACQUA et al., 2016). Portanto, além da capacidade de manter o pH neutro promovida pela VapA, a aquisição de Fe pelo sideróforo *rhequichelin* durante a infecção de macrófagos é necessária para a multiplicação intracelular e patogenicidade de *R. equi*. Esse sideróforo, considerado um fator associado à virulência em *R. equi*, é codificado pelo *cluster rhbABCDE*, onde o gene *rhbC* tem sua expressão gênica aumentada em resposta à depleção de Fe, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2012).

Embora diversos fatores estejam relacionados ao sucesso de *R. equi* como agente etiológico da rodococose equina em potros, a homeostasia de Fe é descrita como fundamental para sobrevivência e patogenicidade de *R. equi*. Tanto *vapA* quanto *rhbC* são genes de virulência necessários para a replicação de *R. equi in vivo* e apresentam expressão gênica aumentada em resposta à privação de ferro em diferentes situações. Por outro lado, os mecanismos de homeostasia de ferro, utilizados por *R. equi* durante a infecção, permanecem pouco compreendidos.

2.3 SIDERÓFOROS IDENTIFICADOS EM *R. equi*

Alguns micro-organismos produzem sideróforos, sistemas que agem com quelantes e possuem alta especificidade e afinidade por Fe^{3+} (BRAUM, 2001). Os sideróforos são classificados de acordo com sua natureza química em: hidroxamatos, catecolatos e carboxilatos (JOHNSTONE & NOLAN, 2015). Diversas funções, além da aquisição de Fe, têm sido atribuídas aos sideróforos, tais como: aquisição de outros metais (zinco, manganês, molibdênio, vanádio, entre outros), moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*), proteção ao estresse oxidativo, antibióticos e seqüestro de metais (JOHNSTONE & NOLAN, 2015).

Até o momento foram identificados dois sideróforos em *R. equi*: *rhequibactin* e *rhequichelin*. *Rhequibactin* é classificado como catecolato e está associado à sobrevivência e replicação de *R. equi* em vida saprófita, não sendo necessário para manutenção de sua virulência (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2008). Por outro lado, *rhequichelin* é classificado como hidroxamato e sua função está relacionada à replicação de *R. equi* no interior de macrófagos via captação de Fe no fagossomo, acredita-se que a sua presença é importante na manutenção da infecção, sendo, portanto, um fator de virulência (MIRANDA-CASOLUENGO et

al.,2012). Acredita-se que *rhequichelin* desempenhe em *R. equi* um papel semelhante ao do sideróforo *mycobactin*, produzido por *Mycobacterium tuberculosis*, o qual compete com a transferrina do hospedeiro (Tf) pelo Fe, prevenindo sua diminuição no interior do fagossomo (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2012).

2.4 IMPORTÂNCIA DA TRANSFERRINA E DA DISPONIBILIDADE DE FERRO DURANTE A INFECÇÃO POR *Rhodococcus equi*

O Fe é um micronutriente essencial para praticamente todos os organismos, contudo, pode causar morte celular quando presente em alta concentração. Em pH fisiológico e ambiente extracelular o Fe^{2+} é rapidamente oxidado para íon férrico (Fe^{3+} , insolúvel), o qual é capturado por proteínas carreadoras de Fe ou estocado em ferritinas, no ambiente intracelular (PASSALACQUA et al., 2016). A toxicidade provocada pela alta concentração de Fe ocorre devido à formação de espécies reativas de oxigênio que causam danos a biomoléculas e podem provocar a morte celular (IMLAY, 2006). Por outro lado, os micro-organismos evoluíram a fim de transpor os efeitos adversos tanto do excesso de Fe, como de restrição, permitindo sua eficiente homeostasia sob diferentes regimes de disponibilidade (ANDREWS et al., 2003). Desta forma, a habilidade de patógenos adquirirem Fe ligado às proteínas do hospedeiro, como a Tf, lactoferrina (Lf) e hemoglobina, é fundamental para sua sobrevivência (RATTLEGE & DOVER, 2000).

Em mamíferos, o Fe permanece sequestrado por glicoproteínas carreadoras (Tf e Lf), que transportam e armazenam esse micronutriente, reduzindo os níveis de Fe extracelular livre para aproximadamente 10^{-18} , impossibilitando assim o crescimento bacteriano dependente de Fe (BULLEN, ROGERS & GRIFFITHS, 1978). Essas glicoproteínas são homólogas e compartilham 59% de identidade e estrutura, além disso, apresentam ligação e liberação do Fe similares (WALLY & BURCHANAN, 2007). A Tf está presente predominantemente no soro, enquanto a Lf está presente em secreções. A Lf desempenha importante função através do aumento da capacidade fagocítica, inibição da formação de biofilme e prevenção da colonização de tecidos do hospedeiro por micro-organismos patogênicos (SIQUEIROS-CENDÓN et al., 2014). Em humanos, a quantidade de Tf como porcentagem total de proteína no líquido

bronco-alveolar (LBA) é muito maior que a quantidade plasmática (WESSELIUS et al., 1992, 1994). A Tf possui diversas variantes/alelos em mamíferos e estudos observaram possíveis correlações entre a variabilidade alélica da Tf equina e a predisposição genética à pneumonia por *R. equi* ou maior resistência à infecção (BRANDON, GIFFARD & BELL, 1999; MOUSEL et al., 2003; NEWTON et al., 2007).

As bactérias possuem proteínas de armazenamento de Fe, denominadas de ferritinas, as quais fornecem reservas de Fe intracelulares para utilização quando os suprimentos externos estão restritos (ANDREWS et al., 2003). Além disso, as ferritinas atuam na desintoxicação de Fe, empregadas para proteger o cromossomo do dano de radicais induzidos pelo Fe livre (ANDREWS et al., 2003; ZHAO et al., 2002). Por esta razão, a homeostase do Fe é regulada com precisão, resultando em praticamente nenhum Fe livre extra ou intracelularmente (ANDREWS et al., 2003). A aquisição bacteriana de Fe pode ocorrer mediante três principais mecanismos: i. sequestro de Fe das proteínas do hospedeiro através de sideróforos quelantes; ii. aquisição de Fe do grupo heme; iii. sequestro direto de Fe ligado às proteínas carreadoras (Tf e Lf), sendo estas proteínas a fonte de ferro mais abundante presente no soro do hospedeiro (WEINBERG, 1998).

A fim de controlar a multiplicação de patógenos, células de mamíferos diminuem a concentração intracelular de Fe como uma medida relacionada à imunidade nutricional do hospedeiro. Desta forma, a aquisição e utilização de Fe é, possivelmente, o principal determinante para o sucesso de um micro-organismo em manter-se no hospedeiro (RATLEDGE & DOVER, 2000). Resultados prévios apontam que a privação de Fe em cultivo *in vitro* resulta na redução significativa do crescimento de *R. equi*, sendo este capaz de adquirir Fe a partir de holo-transferrina bovina (bHTf; 99% Fe-saturada) (JORDAN et al, 2003). Além disso, Jordan et al. (2003) sugere que a apo-transferrina (bATf) tem a capacidade de sequestrar Fe e, conseqüentemente, suprimir o crescimento de *R. equi*. No entanto, a partir do momento que a apo-Tf torna-se saturada de Fe, *R. equi* adquire Fe e sua capacidade de replicar retorna. Outro fator que reforça a importância da homeostasia de Fe por *R. equi* é o fato deste patógeno codificar mecanismos redundantes para dotar-se de Fe, indicando sua evolução genética neste sentido (JORDAN et al., 2003; MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2012). Até o momento, nenhum receptor específico de Tf foi reportado em *R. equi*. Além disso, o mecanismo pelo qual

R. equi adquire Fe *in vivo* pode representar um importante alvo terapêutico e de prevenção da doença. Conforme Von Bargen et al. (2011), estratégias promissoras visando a inibição da sobrevivência de *R. equi* estão relacionadas à redução da disponibilidade de Fe, de modo que mesmo a partir de sideróforos este não esteja em concentração suficiente para a manutenção da multiplicação de *R. equi*, e buscar a inativação das vias que fornecem Fe do hospedeiro diretamente para o espaço intra-fagossômico, no qual *R. equi* replica.

2.5 GLYCERALDEHYDE – 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH) E SUA AÇÃO NA HOMEOSTASIA DO FERRO

A enzima *glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase* (GAPDH) é uma proteína que está presente em eucariotos e procariotos, nos quais desempenha diversas funções, dentre elas a aquisição de Fe (RAJE et al., 2007; MODUN & WILLIAMS, 1999). Em eucariotos, GAPDH está presente na maioria dos fluidos corporais e atua na sinalização celular, defesa contra infecções por micro-organismos, atividade anti-inflamatória, homeostase de Fe, regulação do crescimento e diferenciação celular (RAWAT et al., 2012). Em macrófagos, uma das funções de GAPDH é ser receptora de Lf e Tf (RAJE et al., 2007), sendo este o único receptor de Lf descrito, cuja expressão eleva-se em resposta à privação de Fe (RAWAT et al., 2012). A secreção de GAPDH foi reportada em cultivos celulares de mamíferos, sendo um componente natural do soro que atua como receptor solúvel de Tf (BORADIA, RAJE & RAJE, 2014). Além disso, a sua localização e concentração na superfície celular e sua secreção extracelular são reguladas pela concentração celular de Fe (BORADIA, RAJE & RAJE, 2014). Em eucariotos, a internalização do complexo GAPDH-Tf é realizada por endocitose mediada por clatrina, endocitose por *lipid-raft* e macropinocitose (KUMAR et al., 2012).

GAPDH de origem procariótica é uma proteína de multisubunidades, altamente conservada entre as espécies, o que indica papel central no metabolismo celular, bem como na sobrevivência, virulência microbiana e outras funções relacionadas, como adesina, invasina e proteína ligadora de EGF (*Epidermal Growth Factor*) (BERMUDEZ, 1996; HENDERSON & MARTIN, 2011; BORADIA, RAJE & RAJE, 2014). Além disso, ela é descrita como ligante de Tf e Lf (MODUN & WILLIAMS 1999; WALLY & BUCHANAN, 2007). Em

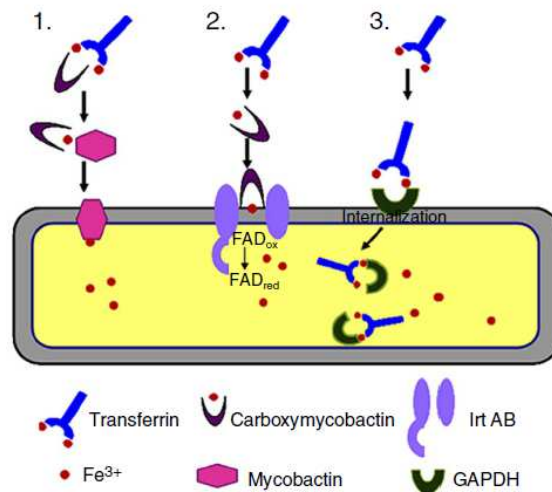
Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* a proteína GAPDH foi identificada como ligante de Fe, removendo-o primeiramente do Lobo-N e depois do Lobo-C da Tf (MODUN & WILLIAMS, 1999). No entanto, o mecanismo exato de aquisição de Fe por GAPDH em procariotos ainda não está completamente elucidado. Na aquisição de Fe por patógenos extracelulares sugere-se que GAPDH possivelmente remova o Fe da Tf e este seja transferido à outra proteína associada à membrana que o transportará para o interior da célula (BORADIA, RAJE & RAJE, 2014). Outra possibilidade seria o sequestro de Tf por outras proteínas, enquanto sua atividade enzimática resulte na acidificação localizada, que induz a liberação de Fe ligado à Tf (TAYLOR & HEINRICHS, 2002).

Em patógenos intracelulares existe uma via alternativa, independente de sideróforo, em que a holo-Tf humana é capturada por GAPDH ancorado na superfície de *M. tuberculosis* e subsequentemente internalizada juntamente com o ligante (Figura 1, representação número 3) (BORADIA et al., 2014). A infecção por *M. tuberculosis* compartilha semelhanças clínicas, microbiológicas e patológicas com a infecção por *R. equi* (COHEN, 2014). O mecanismo descrito por Boradia et al. (2014) envolve a aquisição de Fe através da internalização do complexo GAPDH-Tf e o transporte de macromoléculas pela complexa parede celular micobacteriana, sendo esse fenômeno nunca reportado em outro gênero bacteriano (BORADIA et al. 2014, BORADIA, RAJE & RAJE, 2014). Além disso, Boradia et al. (2014) encontraram GAPDH ativa no citosol, parede celular e membrana citoplasmática, embora a interação com a Tf ocorra principalmente na superfície. Estes autores ainda demonstraram que a expressão de GAPDH é sensível à concentração de Fe e a sua superexpressão aumenta a interação entre a Tf e *M. tuberculosis*, bem como a aquisição de Fe pela célula microbiana (BORADIA et al., 2014).

É evidente que a via GAPDH-Tf/Lf é um meio primitivo de aquisição de Fe, visto que ocorre a conservação funcional deste mecanismo entre procariotos e mamíferos, os quais, por vezes, competem durante a interação patógeno-hospedeiro. Neste sentido, ambos utilizam ferramentas similares para maximizar o sequestro de um recurso limitante e vital à manutenção da célula (BORADIA, RAJE & RAJE, 2014). Além disso, em células eucarióticas submetidas a uma concentração excessiva de Fe, GAPDH promove o efluxo deste micronutriente

através do receptor de apo-Tf (SHEOKAND et al., 2014). Entretanto, ainda não existem estudos avaliando a ação de GAPDH em procariotos sob condições similares.

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de aquisição de Fe oriundo da Tf por *M. tuberculosis*. 1. *Carboxymycobactin* adquire Fe da Tf e o sideróforo *mycobactin* transporta para o interior da célula. 2. Fe oriundo da Tf é transportado para a célula diretamente de *carboxymycobactin* pelo importador de alta afinidade Irt AB. 3. GAPDH interage diretamente com a Tf e promove o transporte e a internalização da holo-transferrina através do complexo GAPDH-Tf, independente de sideróforo.



Fonte: Boradia et al. (2014).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos buscando alternativas para o controle de *R. equi* através da privação de Fe (HARRINGTON, 2006; COHEN et al., 2015; GRESSLER, 2016), todavia, os mecanismos pelos quais *R. equi* realiza a homeostasia de Fe ainda necessitam ser devidamente elucidados. Com base nos dados mencionados e no importante papel de Fe na patogênese da rodococose equina, buscamos explorar a atuação de GAPDH e *rhequichelin* na homeostasia de Fe por *R. equi*. Acredita-se que a partir dos resultados obtidos seja possível identificar pontos-chave neste processo e direcionar novas pesquisas de modo a determinar como estes eventos ocorrem em *R. equi* e, fundamentalmente, como podem ser manipulados a fim de prevenir e/ou controlar infecções por *R. equi*.

3. ARTIGO:**Research paper*****Rhodococcus equi* iron homeostasis by GAPDH and rhequichelin**

Bibiana Petri da Silveira^a, Letícia Trevisan Gressler^{b*}, Agueda Castagna de Vargas^a

(Artigo a ser submetido para publicação – Veterinary Microbiology)

^aLaboratório de Bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105-900, Brasil.

^bLaboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Medicina Veterinária, Instituto Federal Farroupilha (IFFar), Linha 7 de Setembro, BR 386 - KM 40, s/n - Centro, Frederico Westphalen, RS, 98400-000, Brasil

*Corresponding author: Tel.: + 55 55 999521605

Email address: letrevi@gmail.com

***Rhodococcus equi* iron homeostasis by GAPDH and rhequichelin**

Abstract

Rhodococcus equi is a facultative intracellular pathogen that causes severe pneumonia in young foals. Its intra-macrophage survival and replication depends on *vapA* and *rhbC* genes, which produce the virulence associated protein A and the rhequichelin siderophore, respectively. Virulent *R. equi* takes Fe from transferrin (Tf) by undetermined mechanisms. *Mycobacterium* spp. protein GAPDH promotes Fe acquisition from Tf. Our major goal was to determine if GAPDH may have a similar function in *R. equi*, and also to bring new data about *rhbC* and *vapA* expression under iron homeostasis. Therefore, virulent *R. equi* VapA⁺ was cultured under excessive, physiologic and limited-iron concentration at 24 and 48 h for growth rate recovery. The relative transcriptions of GAPDH, *rhbC*, and *vapA* at 48 h post-*in vitro* incubation were analyzed by qPCR and determined after normalization of transcript levels. *R. equi* growth rates reduced proportionally to Fe restriction, which also induced high levels of GAPDH and *vapA* transcription. *rhbC* was significantly up-regulated under both Fe critical starvation and also under iron excessive availability, leading us to hypothesize that rhequichelin may play an anti-oxidant role besides its iron up-taken function previously described. We demonstrated for the first time that GAPDH can play a crucial role in *R. equi* iron homeostasis. Finally, further studies about GAPDH role during *R. equi* intra-macrophage infection and rhequichelin under excessive Fe availability and oxidative stress are needed.

Keywords: Bacteria, gene expression, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, infection, iron acquisition, *rhbC*, siderophore, transferrin, *vapA*.

1. Introduction

Rhodococcus equi is a facultative intracellular pathogen that belongs to the *Actinomycetales* group along with *Mycobacterium tuberculosis* (Mcneil and Brown, 1994) and causes severe foal pneumonia worldwide (Giguère et al., 2011). *Rhodococcus equi* also infects a wide range of animals as well as humans (Prescott, 1991). This pathogen is well recognized by its ability to survive inside macrophages and adapt itself to a stressful environment, with low concentration of essential micronutrients, such as iron (Fe). This phenomenon happens partially due to the presence of a large plasmid encoding virulence genes, being *vapA* the most important so far (Coulson et al., 2010). The *vapA* specific role was recently elucidated and relies on its capability to cause phagosome membrane permeabilization and avoid the acidification of the phagosome lumen, which allows *R. equi* survival and replication (Von Bargen et al., 2018).

Besides *vapA*, other genes are necessary to *R. equi* survival and pathogenicity. *rhbC* gene is part of the *rhbABCDE* cluster that directs the biosynthesis of rhequichelin siderophore, which supports *R. equi* survival within macrophages by acting on Fe homeostasis (Miranda-CasoLuengo et al., 2012). In the host, Fe is transported thru the body by lactoferrin (Lf) and transferrin (Tf) proteins, making it easily unavailable to microorganisms in general (Bullen, Rogers & Griffiths, 1978; Passalacqua et al., 2016). Consequently, the physiological concentration of free Fe is wide lower than pathogens need to survive, pushing them to evolve in order to capture Fe from several sources and environments by different ways (Passalacqua et al., 2016). Previous studies have demonstrated that bovine Tf and Lf can be used as Fe source by virulent *R. equi* (Jordan et al., 2003), which also produces rhequichelin to compete for this

micronutrient with Tf (Miranda-CasoLuengo et al., 2012), although the mechanism of iron acquisition from Tf needs to be clarified.

The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a moonlighting protein that participates in energy metabolism, functional housekeeping functions and several other functions, including Fe acquisition from Tf and Lf by prokaryotic and eukaryotic organisms (Raje et al., 2007). *Mycobacterium* spp. GAPDH plays a role in the Fe acquisition by the internalization of Tf-GAPDH complex (Boradia et al., 2014a). GAPDH of eukaryotic cells also facilitates Fe efflux by the apo-transferrin under toxic levels (Sheokand et al., 2014). Based on GAPDH role in *Mycobacterium* spp., our major goal was to determine if this versatile protein may have a similar function in *R. equi*. Additionally, we aimed to know how *rhbC* and *vapA* behaves under excessive, physiologic and limited-iron concentration, including the presence of Tf as Fe source, since *vapA* and *rhbC* were previously found up-regulated in Fe-deprived environment (Jordan et al., 2003; Miranda-CasoLuengo et al., 2012).

2. Materials and methods

2.1. Bacterium

All experiments in this study were performed using *R. equi* ATCC 33701P⁺, *vapA* positive, lyophilized and stored at -20 °C. Previously to the growth assays, virulent *R. equi* was grown in soy bean casein digest agar (tryptone soy agar) medium (Himedia, India) in aerobiosis at 37 °C for 24 hours.

2.2. Media

Lactate Minimal Medium (LMM) was used as “growth control” representing the iron-replete medium. LMM was prepared using 5 g of $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{l}$, 1.5 g of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{l}$, 1 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{l}$, 0.1 mM of thiamine, 20 mM lactate and 0.2 ml of trace element solution/l adjusted to 7.0 pH by addition of NaOH (Kelly et al., 2002). Trace elements solution consisted of 50 g of EDTA/l, 22 g of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{l}$, 5.54 g of CaCl_2/l , 5.06 g of $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, 4.99 g of $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, 1.10 g of $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, 1.57 g of $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, and 1.16 g of $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$ adjusted to 6.0 pH by the addition of KOH (Vishniac and Santer, 1957). The distilled water used to prepare the media and solutions was treated with Chelex[®] 100 Resin (Bio-Rad, USA) to remove iron as directed by batch method manufacturer (Jordan et al., 2003). The treated water and media were stored in sterile 50 ml polypropylene tubes at 4 °C.

The different levels of iron deprivation were obtained using LMM without iron sulfate addition (LMM-Fe) and LMM-Fe supplemented with 2,2'-bipyridyl (DIP; Sigma-Aldrich, USA) at 50 μM (LMM-Fe+DIP50), 100 μM (LMM-Fe+DIP100), 150 μM (LMM-Fe+DIP150) and 200 μM (LMM-Fe+DIP200) concentration. 2,2'-bipyridyl is a safe iron chelator that is capable of restricting iron to *R. equi* (Jordan et al., 2003). The excessive iron concentration was attained by supplementing LMM-Fe with 75 μM of ferric chloride (ClFe_3) (LMM-Fe+ ClFe_3) (Jordan et al., 2003). LMM and LMM-Fe media were also supplemented with 5 μM of bovine holotransferrin (bHTf) (Gibco[®] by Life Technologies, New Zealand) and bovine apotransferrin (bATf) (Gibco[®] by Life Technologies, New Zealand), and these media were named LMM+bHTf, LMM+bATf, LMM-Fe+bHTf and LMM-Fe+bATf, respectively.

2.3 *R. equi* growth conditions and growth rate measurement

This experiment aimed to determine the *R. equi* growth rate under iron-replete, iron-deplete and iron-accumulated media. Initially, LMM and LMM-Fe were used as *R. equi* pre-growth media during 48 h. Following, the cultures were centrifuged at 1.600 g for 10 min and washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS). The pellet from LMM pre-growth medium was inoculated into LMM, LMM-Fe+ClFe₃, LMM+bATf and LMM+bHTf, while the pellet from LMM-Fe pre-growth medium was inoculated into LMM-Fe, LMM-Fe+DIP50, LMM-Fe+DIP100, LMM-Fe+DIP150, LMM-Fe+DIP200, LMM-Fe+bATf, and LMM-Fe+bHTf. The aim of *R. equi* pre-growth under LMM-Fe was to reduce the *R. equi* intracellular iron storage. The *R. equi* concentration inoculated into the medium was adjusted to approximately 3.5×10^6 CFU/ml spectrophotometrically (Ultrospec 10, Amersham Biosciences, Sweden) at 0.05 optical density (OD) in 600 nm. The incubation conditions consisted of 35 °C at 50 rotations per min (rpm) until 0.5 OD was reached in the control medium (LMM), approximately 48 hours. All cultures were made in a total volume of 25 ml of medium, in duplicate.

The bacterial growth rate was monitored in all experiments at 24- and 48-hours post-incubation, using the OD measurement and the colony forming units (CFU) counting. The number of CFUs was evaluated in Plate Count Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England), incubated for 48 hours at 37 °C. The bacterial growth rates were reported as number of CFUs/ml and the results were compared to control (LMM medium).

2.4. RNA isolation and cDNA synthesis

Rhodococcus equi RNA was isolated from all media described above, except LMM-Fe+DIP150 and LMM-Fe+DIP200 because *R. equi* could not replicate at this level of iron restriction. The cultures were made in two polypropylene flasks until *R. equi* reach 0.5 OD in LMM. The content from two flasks was mixed and all the RNA extractions were carried out with approximately 2×10^9 (average) cells collected by centrifugation from bacterial culture. RNA purifications were performed using RiboPure™ – Bacteria kit (ThermoFisher, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. The optional DNase I treatment for removal of genomic DNA was also performed. The cDNAs were synthesized from 50 ng of RNA by extension of random hexamer primers using the iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's directions.

2.5. qPCR and analyses data

Initially, it was performed a standard curve to determine the qPCR efficiency, according to reagents concentration. The standard curve was constructed using five points and ten-fold dilution of cDNA. The percentage of reaction efficiency (Eff. %) (Table 1) was determined for each pair of primers with the equation $E=10^{(1/s)}$, where s mean the slope of the standard curve. After that, the gene expression assays were performed through relative DNA quantification. The qPCR assays were performed using three biological replicates, two technical replicates and four well-replicates for each culture condition. *gyrB* gene was used as the endogenous control to normalize fold changes in transcript levels. The threshold cycle (Ct) results were exported to StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems, USA) for relative quantification and the fold changes were carried out using the relative quantification $2^{-\Delta\Delta Ct}$

formula.

The qPCR reactions were performed in 96-well plates (MicroAmp® Fast 96- well reaction plate, 0.1 ml, Applied Biosystems, USA) in a final volume of 20 μ L. The mix consisted of 300nM of each primer (Sigma-Aldrich, USA) (Table 1), 10 μ L of PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), and 2 μ L containing 1 ng cDNA. The reaction was carried out in the StepOnePlus™ equipment (Applied Biosystems, USA). The thermal profile consisted of a single denaturation step at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. The melt curve was determined to confirm the specificity of the amplified product. The dissociation protocol consisted of 15 s hold at 95 °C and 60 s hold 60 °C, followed by 20 min slow ramp from 60 °C to 95 °C. The RNA contamination with DNA was ruled out by including controls of RNA before reverse transcriptase reaction.

2.6. Statistical analysis

The homogeneity of variance among groups was compared with Levene test. The growth rates data between treatments and control (LMM) were compared using a one-way ANOVA followed by Tukey test. The relative quantification (RQ) data between treatments and control (LMM) were compared using the non-parametric Mann-Whitney test. Significance was set at a *P* value of <0.05 and the results were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Growth of *R. equi* in different Fe concentrations media

The *R. equi* growth rate averages are presented in Table 2. *Rhodococcus equi* growth rate reduced significantly ($P < 0.05$) under iron limited availability compared to control (LMM) at 24 h post-incubation. This reduction was proportional to DIP supplementation and was also observed under LMM-Fe+bATf medium ($P < 0.05$). As DIP should have chelated the Fe resources, bATf probably worked in the same way. The results at 48 h post-incubation were similar those found at 24 h, except for LMM-Fe+DIP150 and LMM-Fe+DIP200, which did not allow *R. equi* growth. These results justify the absence of LMM-Fe+DIP150 and LMM-Fe+DIP200 treatments in the transcriptional assays. The *R. equi* growth rate did not change under an excessive amount of iron (LMM-Fe+FeCl₃ and LMM+bHTf) compared to control at both times.

3.2. Transcription of *GAPDH*, *rhbC* and *vapA* under limited and excessive amounts of Fe

The results of relative *GAPDH* and *rhbC* expression are represented graphically in Figure 1. The statistical analyzes were made comparing all fold-change results to control (LMM). To confirm the hypotheses that *GAPDH* plays a role in *R. equi* Fe homeostasis, maybe by its relationship with mammal Tf, we analyzed the relative expression of *GAPDH* under several Fe concentrations and Tf supplementation. Overall, the *GAPDH* transcription under limited Fe availability was significantly ($P < 0.05$) higher compared to control. *GAPDH* expression increased 1.8 fold-change in LMM-Fe up to 2.9 in DIP100 (the highest-level Fe restriction). The presence of bATf and bHTf significantly affected *GAPDH* expression. Thus, bATf supplementation significantly increased *GAPDH* expression, while bHTf supplementa-

tion induce the opposite. Under LMM-Fe supplemented with 5 μ M bHTf the GAPDH expression showed a discreet, but significant increase (1.3 fold-change).

The *rhbC* gene expression increased significantly only under critical iron starvation (3.5 fold-change under LMM-Fe+DIP100). Low (LMM-Fe) and moderate (LMM-Fe+DIP50) Fe starvation induced the down-regulation of *rhbC* expression (-2.7 and -1.5-fold-change, respectively), as the bATf and bHTf supplementation to LMM-Fe medium (approximately -3 and 1.9-fold-change, respectively). We observed a significant over-regulation under excessive Fe availability (approximately 4-fold-change under LMM-Fe+FeCl₃ and LMM+bHTf).

The *vapA* gene transcription showed a significant over-regulation in all conditions compared to control (LMM) (P<0.05). We also observed that *vapA* expression increased proportionally to Fe restriction, starting from 3.9-fold-change under LMM-Fe, 6.3 under LMM-Fe+DIP50 to 20 under LMM-Fe+DIP100. Interesting, *vapA* over-expression was also observed under excessive Fe availability (8 fold-change under 75 μ M of FeCl₃). The supplementation with bHTf and bATf also increased *vapA* transcription but in a less pronounced level (around 3-fold-change).

4. Discussion

Rhodococcus equi iron homeostasis may represent an important target for the development of therapeutic and prophylactic strategies against *R. equi* foal pneumonia. To date, it is known that *R. equi* is capable to acquire Fe from bHTf (Jordan et al., 2003) and to produce the rhequichelin siderophore during its intracellular replication (Miranda-CasoLuengo et al., 2012). Recently, Boradia et al. (2014a) demonstrated that GAPDH protein works as Tf receptor during *Mycobacterium* spp. intra-macrophage replication. Therefore, we aimed to search

for new insights on *R. equi* iron homeostasis evaluating GAPDH, *rhbC*, and *vapA* gene expression under excessive, physiologic and limited-iron concentration, including the presence of Tf as Fe source.

Previously to find out GAPDH, *rhbC* and *vapA* gene expression we evaluated the *R. equi* growth rate under all media described before. Limited Fe availability significantly ($P < 0.05$) reduced *R. equi* growth rate compared to control (LMM) at 24 and 48 h post-incubation, and LMM-Fe supplemented with 150 and 200 μ M DIP significantly restricted *R. equi* growth at 48 h (Table 1). These findings were essential to determine the DIP concentrations to induce Fe starvation at critical levels without stopping *R. equi* replication process. The excessive Fe availability (LMM-Fe+FeCl₃ and LMM+bHTf) did not change *R. equi* growth rate, as observed previously by Jordan et al. (2003). An interesting find from this experiment was the change of *R. equi* colony phenotypic profile under LMM-Fe+ClFe₃, where the UFCs were larger and more mucoid compared to CFUs from other treatments (data not shown). We believe that *R. equi* Fe storage, even after its pre-growth in Fe restriction before the incubation into LMM-Fe, was enough to keep *R. equi* replication level similar to control 48 h post-incubation. Thus, we cannot know if bHTf (5 μ M) supplementation to LMM-Fe could restore the Fe necessity to *R. equi* survival, as observed by Jordan et al. (2003) using LMM-Fe supplemented with bHTf 30 μ M. Conversely, we demonstrated that LMM-Fe supplemented with bATf (5 μ M) induced Fe chelation, once the *R. equi* growth rate was significantly reduced under LMM-Fe+bATf at 24 h post-infection.

Our findings clearly demonstrated that GAPDH expression increases according to Fe starvation, suggesting that GAPDH plays a crucial role in *R. equi* Fe up-taken. *M. tuberculosis*, a bacillus that shares many morphotintorial and pathological characteristics

with *R. equi*, secretes GAPDH and acquires Fe from Tf by the internalization of Tf-GAPDH complex (Boradia et al., 2014a). This phenomenon is also observed in eukaryotic cells (Boradia et al., 2014b), which use similar tools to maximize sequestration of a limiting and vital resource (Boradia et al., 2014b), as a mechanism of nutritional immunity (Ratledge and Dover, 2000). The GAPDH use as a reference housekeeping gene in eukaryotes and prokaryotes, which transcriptional levels are considered stable under different experimental conditions should be taken carefully. It is important to highlight that GAPDH transcription is influenced by environmental Fe availability and researchers should be aware of choosing it as an endogenous control in gene expression assays (Zhang, et al., 2014).

This is the first study which evaluated the *R. equi* gene expression in excessive Fe availability. Based on the eukaryotic GAPDH ability to promote Fe efflux (Sheokand et al., 2014), we hypothesized that *R. equi* GAPDH could also export Fe when exposed to high levels, which was not observed here using the performed tests. We should consider that FeCl₃ supplementation at 75 μ M might not have been enough to promote GAPDH over-expression, as may exist other mechanisms to deal with excessive Fe condition, which would save more energy than efflux systems.

The mechanism behind the siderophore rhequichelin action is not well understood. When growing in low and moderate Fe restriction we observed a significant decrease in *rhbC* transcription. This may have occurred because *R. equi* used other mechanisms for Fe up-taken before critical Fe-depletion, and GAPDH may have been one of them. We noticed a significant *rhbC* over-expression at critical Fe starvation condition. Also, Miranda-CasoLuengo et al. (2012) observed that *R. equi rhbCD* deleted strain was unable to grow in the presence of 80 μ M DIP. Our results corroborate with those finds since the concentration of 100 μ M DIP

induced expressive *rhbC* over-expression. Therefore, we believed that *rhbC* is extremely necessary when Fe concentration is critical and may be a *R. equi* limiting growth-factor.

The increase of *rhbC* gene transcription when Fe was accumulated in the environment was an unexpected find. The LMM supplementation with 75 μMFeCl_3 promoted the highest level of *rhbC* expression relative to control. Although the *rhbABCDE* cluster encodes the hydroxamate siderophore rhequichelin for Fe up-take (Miranda-Casoluengo et al., 2012), we believe that rhequichelin can act as Fe detox system, as other bacterial siderophores used to metal detoxification (Cortese et al., 2002; Kraepiel et al., 2009). Besides Fe up-take, siderophores act on other metals (i.e., zinc and manganese) up-take, as signaling molecules, protection from oxidative stress, antibiotics-ligands and also in metal sequestration (Johnstone et al., 2015).

Iron homeostasis and protection against oxidative stress are closely related due to free Fe oxidative damage (Achard et al., 2013). The ability to produce siderophores enhances bacterial survival in the macrophage due to the ability to protecting them from reactive oxygen species (Adler et al., 2012, 2014). Scherettl et al. (2007) studied a fungi hydroxamate siderophore which plays an antioxidant role by its ability to chelate Fe, thus we believe that rhequichelin might function in a similar way. Miranda-Casoluego et al. (2012) observed *rhbC* over-expression in the intracellular environment, probably due intra-macrophage Fe deprivation or oxidative stress.

The *vapA* expression has been deeply studied, however, its behavior under excessive Fe availability had not been addressed so far (Ren and Prescott, 2003). *vapA* respond increasing its expression for many different conditions. Here we found that excessive Fe availability induced *vapA* up-regulation similarly to observed under moderate Fe restriction. Other studies

have demonstrated that Fe starvation induces *vapA* over-expression (Ren and Prescott, 2003), however, *vapA* up-regulation under excessive Fe availability needs to be properly evaluated.

Iron is an essential micronutrient for *R. equi* survival and replication, thereby providing a potential target for therapeutic and prophylactic strategies (Harrington et al., 2006). Due to the emergency of *R. equi* antimicrobial resistance (Fenton and Buckley, 2015; Giguère et al., 2010) it is necessary to search for alternatives to rhodococcosis therapy. Drugs with a potential to reduce *R. equi* Fe acquisition have been studied and the results revealed promising options for rhodococcosis treatment and prophylactic strategies (Cohen et al., 2015; Gressler et al., 2016). However, pathogens, including *R. equi*, have multiple mechanisms to acquire Fe during host infection. In this context, it is important to understand the mechanisms involved in the Fe homeostasis in order to guide the search for new therapies, other than antibiotic compounds.

5. Conclusion

In summary, our results reinforce the knowledge that Fe is an essential element to *R. equi* replication. As a key point in this study, we demonstrated for the first time the putative role of GAPDH in *R. equi* replication and survival under Fe limited condition, such as found intra-macrophage. We demonstrate that GAPDH is up-regulated during Fe starving replication, suggesting its putative function in Fe up-take. *rhbC* gene was found up-regulated under critical Fe starvation and under excessive Fe concentration, impaling that besides Fe up-take, rhequichelin can play an anti-oxidant role. The rhequichelin presumed role as anti-oxidative agent during *R. equi* intracellular survival should be investigated. *vapA* is up-

regulated at both limited and excessive Fe concentrations. Finally, more studies are needed to elucidate the putative GAPDH and rhequichelin during *R. equi* iron homeostasis.

Conflicts of interest: none.

Acknowledgements - The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the Masters scholarship and the resources of the Edital Universal 14/2014 – Concession 455454/2014-0. This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Achard, M.E.S., Chen, K.W., Sweet, M.J., Watts, R.E., Schroder, K., Schembri, M.A., Ewan, A.G.M.C., 2013. An antioxidant role for catecholate siderophores in *Salmonella*. *Biochem. J.* 454, 543–549. doi:10.1042/BJ20121771
- Adler, C., Corbala, N.S., Seyedsayamdost, M.R., Pomares, F., Cristobal, R.E., Clardy, J., Kolter, R., Vincent, P.A., 2012. Catecholate Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. *PLoS One* 7, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0046754
- Adler, C., Corbalan, N.S., Peralta, D.R., Pomares, F., De Cristobal, R.E., Vincent, P.A., 2014. The Alternative Role of Enterobactin as an Oxidative Stress Protector Allows *Escherichia coli* Colony Development. *PLoS One* 9, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0084734
- Boradia, V.M., Malhotra, H., Thakkar, J.S., Tillu, V.A., Vuppala, B., Patil, P., Sheokand, N.,

- Sharma, P., Chauhan, A.S., Raje, M., Raje, C.I., 2014a. *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin. Nat. Commun. 5. doi:10.1038/ncomms5730
- Boradia, V.M., Raje, M., Raje, C.I., 2014b. Protein moonlighting in iron metabolism: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Biochem. Soc. Trans. 42, 1796–1801. doi:10.1042/BST20140220
- Bullen, J., Rogers, H., Griffiths, E., 1978. Role of iron in bacterial infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1–35. doi:10.1007/978-3-642-66956-9_1
- Cohen, N.D., Slovis, N.M., Giguère, S., Baker, S., Chaffin, M.K., Bernstein, L.R., 2015. Gallium Maltolate as an Alternative to Macrolides for Treatment of Presumed *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. J. Vet. Inter. Med. 29, 932–939. doi:10.1111/jvim.12595
- Cortese, M.S., Paszczyński, A., Lewis, T.A., Sebat, J.L., Crawford, R.L., 2002. Metal chelating properties of pyridine-2, 6-bis (thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp . and the biological activities of the formed complexes. BioMetals 15, 103–120.
- Coulson, G.B., Agarwal, S., Hondalus, M.K., 2010. Characterization of the role of the pathogenicity island and vapG in the virulence of the intracellular actinomycete pathogen *Rhodococcus equi*. Infect. Immun. 78, 3323–3334. doi:10.1128/IAI.00081-10
- Fenton, C.S., Buckley, T.C., 2015. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and rifampin for *Rhodococcus equi* during the years 2007-2014. Ir. Vet. J. 68, 23–27. doi:10.1186/s13620-015-0051-4
- Giguère, S., Cohen, N.D., Keith Chaffin, M., Hines, S.A., Hondalus, M.K., Prescott, J.F., Slovis, N.M., 2011. *Rhodococcus equi*: Clinical Manifestations, Virulence, and Immuni-

- ty. J. Vet. Intern. Med. 25, 1221–1230. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00804.x
- Giguère, S., Lee, E., Williams, E., Cohen, N.D., Chaffin, M.K., Halbert, N., Martens, R.J., Franklin, R.P., Clark, C.C., Slovis, N.M., 2010. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates. J. Am. Vet. Assoc. 237, 74–81. doi:10.2460/javma.237.1.74
- Gressler, L.T., Bordin, A.I., McQueen, C.M., Cohen, N.D., de Vargas, A.C., 2016. Chloroquine inhibits *Rhodococcus equi* replication in murine and foal alveolar macrophages by iron-starvation. Vet. Microbiol. 188, 16–24. doi:10.1016/j.vetmic.2016.03.019
- Harrington, J.R., Golding, M.C., Martens, R.J., Halbert, N.D., Cohen, N.D., 2005. Evaluation of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent *Rhodococcus equi*. Am. J. Vet. Res. 66, 755–761. doi:10.2460/ajvr.2005.66.755
- Harrington, J.R., Martens, R.J., Cohen, N.D., Bernstein, L., 2006. Antimicrobial activity of gallium against virulent *Rhodococcus equi* *in vitro* and *in vivo*. J. vet. Pharmacol. Ther. 29, 121–127. doi:10.1111/j.1365-2885.2006.00723.x
- Johnstone, T.C., Nolan, E.M., 2015. Beyond Iron: Non-Classical Biological Functions of Bacterial Siderophores 44, 1922–2013. doi:10.1080/10937404.2015.1051611
- Jordan, M.C., Harrington, J.R., Cohen, N.D., Tsolis, R.M., Dangott, L.J., Weinberg, E.D., Martens, R.J., 2003. Effects of iron modulation on growth and viability of *Rhodococcus equi* and expression of virulence-associated protein A. Am. J. Vet. Res. 64, 1337–1346. doi:10.2460/ajvr.2003.64.1337
- Kelly, B.G., Wall, D.M., Boland, C.A., Meijer, W.G., 2002. Isocitrate lyase of the facultative

- intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Microbiology* 148, 793–798.
doi:10.1099/00221287-148-3-793
- Kraepiel, A.M.L., Bellenger, J.P., Wichard, T., Morel, T.W.Æ.F.M.M., 2009. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria 22, 573–581.
doi:10.1007/s10534-009-9222-7
- Mcneil, M., Brown, J., 1994. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 357–417. doi:10.1128/CMR.7.3.357
- Miranda-CasoLuengo, R., Coulson, G.B., Miranda-CasoLuengo, A., Vázquez-Boland, J.A., Hondalus, M.K., Meijer, W.G., 2012. The hydroxamate siderophore rhequichelin is required for virulence of the pathogenic actinomycete *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 80, 4106–4114. doi:10.1128/IAI.00678-12
- Nathan, C.F., 1983. Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 620–630. doi:10.1016/0035-9203(83)90190-6
- Passalacqua, K.D., Charbonneau, M., Riordan, M.X.D.O., Arbor, A., 2016. Bacterial metabolism shapes the host: pathogen interface. *Microbiol Spectr.* 4, 1–31.
doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0027-2015.Bacterial
- Prescott, J.F., 1991. *Rhodococcus equi*: An animal and human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 20–34. doi:10.1128/CMR.4.1.20
- Raje, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S., Raje, M., 2007. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 3252–3261. doi:10.1074/jbc.M608328200
- Ratledge, C., Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.881

- Ren, J., Prescott, J.F., 2003. Analysis of virulence plasmid gene expression of intramacrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet. Microbiol.* 94, 167–182. doi:10.1016/S0378-1135(03)00099-3
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Jr, H.N.A., Haynes, K., Haas, H., 2007. Distinct Roles for Intra- and Extracellular Siderophores during *Aspergillus fumigatus* Infection. *PLoS Pathog* 3, e128. doi:10.1371/journal.ppat.0030128
- Sheokand, N., Malhotra, H., Kumar, S., Tillu, V.A., Chauhan, A.S., Raje, C.I., Raje, M., 2014. Moonlighting cell-surface GAPDH recruits apotransferrin to effect iron egress from mammalian cells. *J. Cell Sci.* 127, 4279–4291. doi:10.1242/jcs.154005
- Von Bargen, K., Scraba, M., Krämer, I., Ketterer, M., Nehls, C., Krokowski, S., Repnik, U., Wittlich, M., Maaser, A., Zapka, P., Bunge, M., Schlesinger, M., Huth, G., Klees, A., Hansen, P., Jeschke, A., Bendas, G., Utermöhlen, O., Griffiths, G., Gutschmann, T., Wohlmann, J., Haas, A., 2018. Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. *Cell. Microbiol.* e12958. doi:10.1111/cmi.12958
- Vishniac, W., Santer, M., 1957. The Thiobacilli. *Bacteriol. Rev.* 21, 195–213.
- Zhang, J., Tang, H., Zhang, Y., Deng, R., Shao, L.I., Liu, Y.U.N., Li, F., Wang, X., Zhou, L., 2014. Identification of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Int. J. Mol. Med.* 33, 1209-1218. doi:10.3892/ijmm.2014.1695

Figure captions

Fig.1. Relative gene expression of GAPDH and *rhbC* from *R. equi* cultivated in several iron concentrations and supplemented with apo and holo-Tf were compared to the control LMM. The values were calculated from the means are from three independent experiments, with cultures performed in duplicate in each experiment; the qPCR assays were performed twice using four well replicates for each cDNA sample. Bars indicate SEM. Asterisks represent statistical difference from LMM (iron-replete control) ($P < 0.05$). Legend: LMM – control media, replete-iron Lactate Minimal Media (LMM); LMM-Fe - LMM without Fe; LMM-Fe+DIP50, LMM-Fe+DIP100, LMM-Fe+DIP150 and LMM-Fe+DIP200 - LMM-Fe supplemented with 50, 100, 150 and 200 μM of dipyridyl, respectively; LMM-Fe+FeCl₃ – control with FeCl₃ supplementation (75 μM); LMM+bHTf and LMM+bATf – LMM supplemented with 5 μM of bovine holotransferrin and apotransferrin, respectively; LMM-Fe+bHTf and LMM-Fe+bATf – LMM-Fe supplemented with 5 μM of bovine holo-transferrin and apo-transferrin, respectively; RQ – Relative quantification.

Table 1. Oligonucleotides, used in this study, and their percentage of reaction efficiency (Eff. %).

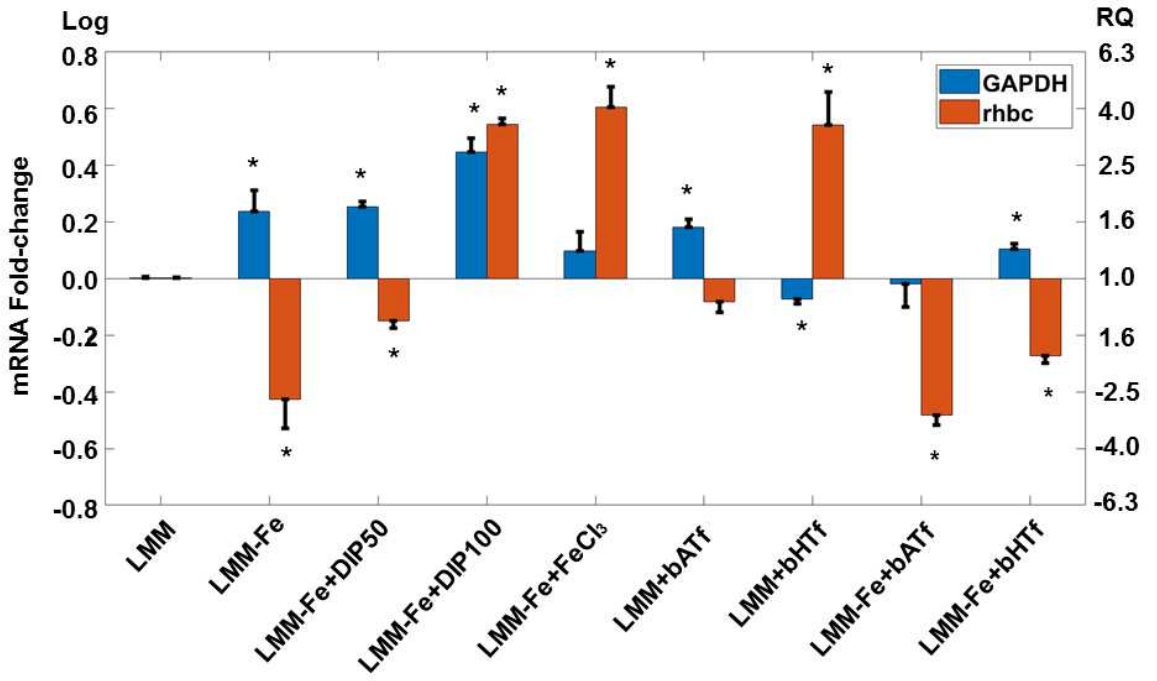
Oligonucleotide	Nucleotide sequence 5' - 3'	Eff. %	Reference
gyrB-F	GGAGATGGCGTTCCTCAACA	93.9	This study
gyrB-R	TAGTGGTAGACGCGGGACTT		
GAPDH-F	AGTACGACTCGATCCTGGGT	93.1	This study
GAPDH-R	GTGAAGATGCCCGTGGACTC		
vapA-F	AACGGTCGAGCAAGCGATAC	92.4	(Harrington et al., 2005)
vapA-R	GGCCCGAATACGTGAAACCT		
RhbC-F	ATCGAACTGATGGTCGCGTT	104.4	This study
RhbC-R	GGATGCGTTCGATTCCGTTG		

Table 2. *R. equi* average growth rates (CFU/ml) under different levels of iron availability.

Legend: LMM – control media, replete-iron Lactate Minimal Media (LMM); LMM-Fe - LMM without Fe; LMM-Fe+DIP50, LMM-Fe+DIP100, LMM-Fe+DIP150 and LMM-Fe+DIP200 - LMM-Fe supplemented with 50, 100, 150, and 200 μM of 2,2'-bipyridyl, respectively; LMM-Fe+ ClFe₃- control with 75 μM FeCl₃ supplementation; LMM+bHTf and LMM+bATf – LMM supplemented with 5 μM of bovine holo and apo-Tf, respectively; LMM-Fe+bHTf and LMM-Fe+bATf – LMM-Fe supplemented with 5 μM of bovine holo and apo-Tf, respectively, SEM – Standard Error of the Mean. Note: the presence of * means that the result differs from the control (P<0.05).

Medium	Culture time (h)					
	0		24		48	
	Average	SEM	Average	SEM	Average	SEM
LMM	3.5×10^6	1.8×10^5	1.6×10^8	7.4×10^7	1.8×10^8	8.9×10^7
LMM-Fe	3.5×10^6	1.8×10^5	4.0×10^7	2.0×10^7	5.0×10^7	1.8×10^7
LMM-Fe +DIP50	3.5×10^6	1.8×10^5	$1.9 \times 10^7^*$	1.0×10^7	$2.7 \times 10^7^*$	1.2×10^7
LMM-Fe +DIP100	3.5×10^6	1.8×10^5	$1.2 \times 10^7^*$	2.5×10^5	$1.7 \times 10^7^*$	4.7×10^6
LMM-Fe +DIP150	3.5×10^6	1.8×10^5	$1.3 \times 10^5^*$	8.8×10^3	$2.1 \times 10^5^*$	5.7×10^3
LMM-Fe +DIP200	3.5×10^6	1.8×10^5	$9.8 \times 10^5^*$	3.0×10^4	0*	0
LMM-Fe+ClFe ₃	3.5×10^6	1.8×10^5	1.1×10^8	3.0×10^7	1.2×10^8	2.7×10^7
LMM+bATf	3.5×10^6	1.8×10^5	6.3×10^7	6.6×10^6	9.7×10^7	8.2×10^6
LMM+bHTf	3.5×10^6	1.8×10^5	9.7×10^7	3.9×10^7	1.2×10^8	4.0×10^7
LMM-Fe +bATf	3.5×10^6	1.8×10^5	$2.4 \times 10^7^*$	1.1×10^7	3.9×10^7	1.7×10^7
LMM-Fe +bHTf	3.5×10^6	1.8×10^5	6.7×10^7	2.0×10^7	9.4×10^7	2.8×10^7

Figure 1.



Highlights

- *R. equi* GAPDH is regulated by *in vitro* Fe availability.
- GAPDH gene is significantly up-regulated under limited Fe availability.
- *rhbC* gene is significantly up-regulated under critical Fe starvation.
- *rhbC* and *vapA* genes are significantly up-regulated under excessive Fe availability.

4. CONCLUSÃO

O Fe é um micronutriente essencial para o crescimento de *R. equi*. Múltiplos mecanismos atuam promovendo sua homeostasia, possibilitando a replicação de *R. equi* em ambientes onde Fe esteja presente em concentrações limitadas ou excessivas. GAPDH e o sideróforo *rhequichelin* representam alguns desses mecanismos, os quais possuem um papel importante na replicação e na sobrevivência de *R. equi* em condições de estresse, como encontrado durante a infecção no interior do macrófago.

A aquisição de Fe oriundo de Tf pode representar um importante fator de virulência em *R. equi*. A glicoproteína GAPDH é capaz de captar Fe a partir da Tf em eucariotos e em *Mycobacterium* spp. Em *R. equi*, nós observamos que a transcrição de GAPDH é sensível a privação de Fe, aumentando em resposta à restrição, sugerindo que esta proteína possivelmente participe da aquisição de Fe por *R. equi*. Além disso, o gene GAPDH vem sendo amplamente utilizado como controle endógeno em estudos de expressão gênica, tanto para organismos eucariotos quanto procariotos, o que deve ser considerado com cautela.

O sideróforo *rhequichelin* é necessário para a sobrevivência e replicação intracelular de *R. equi* devido a sua capacidade de promover a aquisição de Fe nessa condição. Nós observamos o aumento na expressão do gene *rhbC* em situação crítica de restrição de Fe, bem como quando este estava presente em concentrações excessivas. Estes resultados sugerem que além de participar da aquisição de Fe, o sideróforo *rhequichelin* pode atuar como antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo como consequência da sua habilidade de sequestrar Fe livre. Esta suposta atividade antioxidante pode desempenhar um papel chave na replicação intracelular de *R. equi*, onde as células do hospedeiro promovem o estresse oxidativo como mecanismo de defesa a patógenos. Por fim, a expressão gênica do gene de virulência *vapA* apresentou-se elevada não apenas sob restrição de Fe, mas também durante o acúmulo deste.

São necessários estudos mais aprofundados para explicar os mecanismos pelos quais GAPDH e o sideróforo *rhequichelin* atuam na homeostasia de Fe por *R. equi* e na sua sobrevivência em condições de estresse. A partir da compreensão dos mecanismos envolvidos na homeostasia de Fe por *R. equi* pode-se buscar por alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e profiláticas associadas à imunidade nutricional, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M. *et al.* Athletic performance of horses previously infected with *R. equi* pneumonia as foals. In: **Troceedings of the 43rd Annual Convention of the American Association of Equine Practioners (AAEP)**, Denver, v. 43, p. 81-82, 1997.
- ANASTASI, E. *et al.* Novel transferable erm(46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in *Rhodococcus equi*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 3184-3190, 2015.
- ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K., RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews** 27, 215-237, 2003.
- BENOIT, S. *et al.* H(2)O(2), which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infection and immunity**, v. 70, p. 3768-3776, 2002.
- BERMUDEZ, L.E., PETROFSKY, M., SHELTON, K. Epidermal growth factor-binding protein in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*: a possible role in the mechanism of infection. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2917–2922, 1996.
- BORADIA, V.M. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin. **Nature communications**, v. 5, p. 4730, 2014.
- BORADIA, V.M.; RAJE, M.; RAJE, C.I. Protein moonlighting in iron metabolism: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 6, p. 1796-1801, 2014.
- BRANDON, R.B.; GIFFARD, J.M.; BELL, K. Single nucleotide polymorphisms in the equine transferrin gene. **Animal genetics**, v. 30, p. 439-443, 1999.
- BRAUN, V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 2, p. 67–79, 2001.
- BULLEN, J.J.; ROGERS, H.J.; GRIFFITHS, E. Role of iron in bacterial infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 80, p. 1-35, 1978.
- COHEN, N.D. *Rhodococcus equi* Foal Pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, n.3, p. 609-622, 2014.
- COHEN, N.D. *et al.* Gallium Maltolate as an Alternative to Macrolides for Treatment of Presumed *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 932-939, 2015.

COULSON, G.B.; AGARWAL, S.; HONDALUS, M.K. Characterization of the Role of the Pathogenicity Island and vapG in the Virulence of the Intracellular Actinomycete Pathogen *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3323-3334, 2010.

CUI, L. *et al.* Purulent meningitis caused by *Rhodococcus equi* a case report. **Medicine**, v. 97, n. 24, p. 1-3, 2018.

CYWES-BENTLEY, C. *et al.* Antibody to Poly-N-acetyl glucosamine provides protection against intracellular pathogens: Mechanism of action and validation in horse foals challenged with *Rhodococcus equi*. **Plos Pathogens**, v. 14, n. 7, e1007160, 2018.

ESALQ. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2016. **Universidade de São Paulo (USP)**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em out. 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural Data - FAOSTAT**, 2014. Online. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em out. 2017.

GIGUÈRE, S. *et al.* Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3548-3557, 1999.

GIGUÈRE, S. *et al.* Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 59-63, 2002.

GIGUÈRE, S. *et al.* Diagnosis, treatment, control, and prevention of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 25, p. 1209-1220, 2011.

GIGUÈRE, S., *et al.* *In vitro* synergy, 24 pharmacodynamics, and postantibiotic effect of 11 antimicrobial agents against 25 *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 160, p. 207-213, 2012.

GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L.J.; WILLINGHAM-LANE, J.M.. Antimicrobial Resistance in *Rhodococcus equi*. **Microbiology Spectrum**, v.5, n.5, p. 67-85, 2017.

GILES, C. *et al.* *Rhodococcus equi* (*Prescottella equi*) vaccines; the future of vaccine development. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, p. 510-518, 2015.

GRESSLER, L.T. *et al.* Chloroquine inhibits *Rhodococcus equi* replication in murine and foal alveolar macrophages by iron-starvation. **Veterinary Microbiology**, v. 188, p. 16-24, 2016.

HAMM, AFONSO. **Projeto De Lei N.º 7.920/2017**. Confere o título de Capital Nacional da Criação de Cavalos da raça Puro Sangue Inglês ao município de Bagé, no Estado do Rio

Grande do Sul. p. 1–2, 2017. Disponível em:

<<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/1543767.pdf>>

HARVEY, R.L., SUNSTRUM, J.C. *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 139–145, 1991.

HÉBERT, L. *et al.* Study of lysozyme resistance in *Rhododoccus equi*. **Current Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 352-357, 2014.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 3476–3491, 2011.

HUBER, L. *et al.* Emergence of resistance to macrolides and rifampin in clinical isolates of *Rhodococcus equi* from foals in central Kentucky, 1995 to 2017. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, p. e01714-18, 2018a.

HUBER, L. *et al.* Monitoring foals by thoracic ultrasonography, bacterial culture and PCR: diagnostic of *Rhodococcus equi* subclinical pneumonia in south of Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 60, p. 104–108, 2018b.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pecuária 2015**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pecuaria2015>>, acesso em outubro de 2017.

IMLAY, J. A. MicroReview Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 1073–1082, 2006.

JAIN, S.; BLOOM, B. R.; HONDALUS M. K. Deletion of vapA encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 115–128, 2003.

JOHNSTONE, T. C.; NOLAN, E. M. Beyond Iron: Non-Classical Biological Functions of Bacterial Siderophores. **Dalton Transactions** v. 44, n. 14, p. 1922–2013, 2015.

JORDAN, M.C. *et al.* Effects of iron modulation on growth and viability of *Rhodococcus equi* and expression of virulence-associated protein A. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 1337-1346, 2003.

KEDLAYA, I.; ING, M.B.; WONG, S.S. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 39-46, 2002.

KELLY, B.K. *et al.* Isocitrate lyase of the facultative intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **Microbiology**, v. 148, p. 793–798, 2002;

- KUMAR, S.; SHEOKAND, N.; MHADESHWAR, M.A.; RAJE, C.I.; RAJE, M. Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel transferrin receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.44, p. 189–199, 2012.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Equídeos**. 2016. Online. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em out. 2017.
- MIRANDA-CASOLUENGO, R. *et al.* The iron-regulated *iupABC* operon is required for saprophytic growth of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* at low iron concentration. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 3438-3444, 2005.
- MIRANDA-CASOLUENGO, R. *et al.* The intracellular pathogen *Rhodococcus equi* produces a catecholate siderophore required for saprophytic growth. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 5, p. 1631–1637, 2008.
- MIRANDA-CASOLUENGO, R. *et al.* The hydroxamate siderophore rhequichelin is required for virulence of the pathogenic actinomycete *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 80, p. 4106-4114, 2012.
- MODUN, B.; WILLIAMS, P. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1086-1092, 1999.
- MOUSEL, M.R. *et al.* *Rhodococcus equi* and genetic susceptibility: assessing transferrin genotypes from paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 470-472, 2003.
- NEWTON, J.R.; WOODT, J.L.; CHANTER, N. Evidence for transferrin allele as a host-level risk factor in naturally occurring equine respiratory disease: a preliminary study. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, p. 164-171, 2007.
- PASSALACQUA, K. D. *et al.* Bacterial metabolism shapes the host pathogen interface. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, p. 1–31, 2016.
- PRESCOTT, J.F., *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, p. 20-34, 1991.
- PRESCOTT, J.F.; MEIJER, W.G.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Capítulo 9: *Rhodococcus equi*, In: GYLES, C.L. *et al.* **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. P. 149-166. ISBN: 9780470958209

- RAJE, C.I. *et al.* The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 3252–3261, 2007.
- RATLEDGE, C.; DOVER, L.G., Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 881-941, 2000.
- RAWAT, P.; KUMAR, S.; SHEOKAND, N.; RAJE, C.I.; RAJE, M. The multifunctional glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a novel macrophage lactoferrin receptor. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, p. 329–338, 2012.
- REN, J.; PRESCOTT, J.F. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 167-182, 2003.
- RIBEIRO, M.G *et al.* Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, p. 53-61, 2005.
- SANZ, M.G.; LOYNACHAN, A.; HOROHOV, D.W. *Rhodococcus equi* hyperimmune plasma decreases pneumonia severity after a randomised experimental challenge of neonatal foals. **Veterinary Record**, v. 178, n. 11, p. 261, 2016.
- SHEOKAND, N. *et al.* Moonlighting cell-surface GAPDH recruits apotransferrin to effect iron egress from mammalian cells. **Journal of Cell Science**, v. 127, p. 4279-4291, 2014.
- SIQUEIROS-CEDÓN, T. *et al.* Immunomodulatory effects of lactoferrin. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, p. 557-566, 2014.
- SLOVIS, N.M., MCCRACKEN, J.L., MUNDY, G. How to use thoracic ultrasound to screen foals for *Rhodococcus equi* at affected farms. **American Association of Equine Practitioners**, v. 51, p. 274-278, 2005.
- TAKAI, S., *et al.* Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4056–4060, 1991.
- TAKAI, S., *et al.* DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 6840–6847, 2000.
- TAYLOR, J.M.; HEINRICHS, D.E. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1603–1614, 2002.
- TOOTSI, K.; TAMM, H.; LAISAAR, T. Isolated mediastinal lymphadenopathy caused by *Rhodococcus equi* infection. **The Annals of Thoracic Surgery**, v 106, n.2, p. 77-79, 2018.

TOYOOKA, K.; TAKAI, S.; KIRIKAE, T. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1007–1015, 2005.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. *et al.* *Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 9-33, 2013.

VECHI, H.T. *et al.* Chronic cavitary pneumonia by *Rhodococcus equi* in a highly prevalent tuberculosis country: a diagnosis challenge. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, p. 74-79, 2018.

VENNER, M., KERTH, R., KLUG, E. Evaluation of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals. **Veterinary Journal**, v. 174, p. 418-421, 2007.

VENNER, M. *et al.* Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing sub-clinical pulmonary abscess on a farm with endemic infectious caused by *Rhodococcus equi*. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 293-298, 2012.

VON BARGEN, K., M. *et al.* *Rhodococcus equi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 5676–5681, 2009.

VON BARGEN, K. *et al.* Nitric oxide-mediated intracellular growth restriction of pathogenic *Rhodococcus equi* can be prevented by iron. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 2098–2111, 2011.

VON BARGEN, K. *et al.* Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. **Cellular Microbiology**, n. August, p. e12958, 2018.

WALLY, J.; BUCHANAN, S.K. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. **Biometals**, v. 20, p. 249–262, 2007.

WEINBERG, E.D. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. **Journal of American Medical Association**, v. 231, p. 39-41, 1975.

WEINBERG, E.D. Patho-ecological implications of microbial acquisition of host iron. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 9, p. 171, 1998.

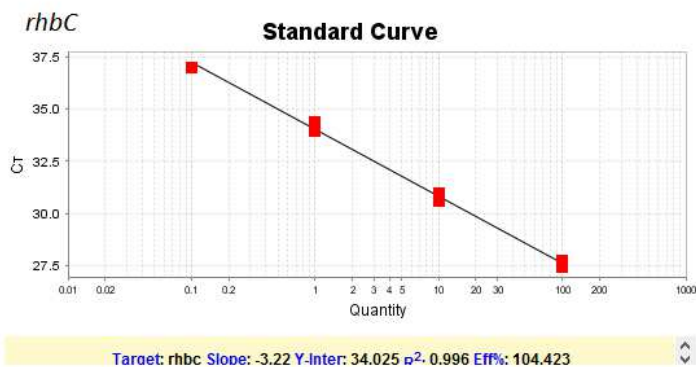
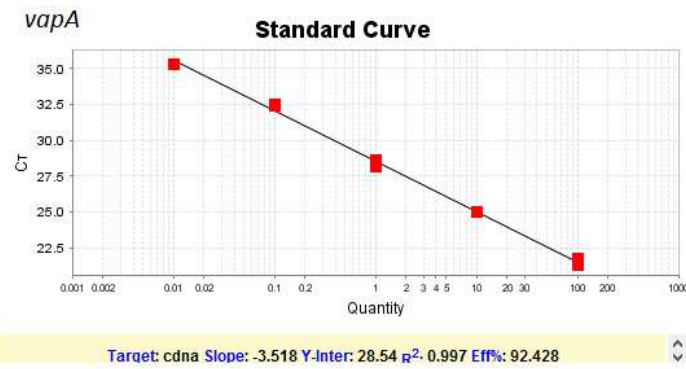
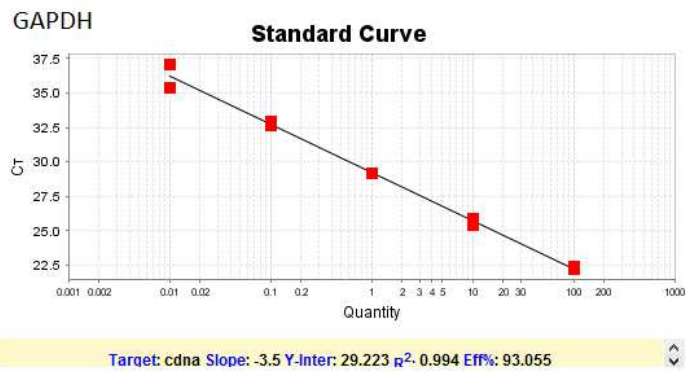
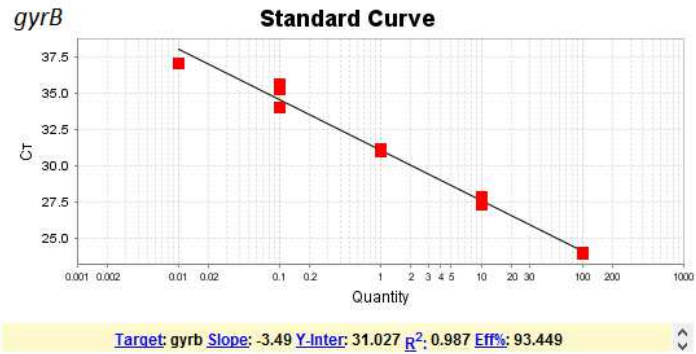
WESSELIUS, L.J.; FLOWERS, C.H.; SKIKNE, B.S. Alveolar Macrophage Content of Isoferritins and Transferrin: Comparison of Nonsmokers and Smokers with and without Chronic Airflow Obstruction. **American Review of Respiratory Disease**, v. 145, p. 311-316, 1992.

WESSELIUS, L.J.; NELSON, M.E.; SKIKNE, B.S. Increased release of ferritin and iron by iron-loaded alveolar macrophages in cigarette smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, p. 690-695, 1994.

ZHAO, G.H. *et al.* Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 27689-27696, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A - CURVAS PADRÃO DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA qPCR (*gyrB*, *GAPDH*, *vapA* e *rhbC*).



APÊNDICE B – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA OBTIDO EM CADA UM DOS TRÊS ENSAIOS BIOLÓGICOS (A, B E C) EM DUPLICATA DA TÉCNICA.

Ensaio biológico		A		B		C		
Replicata da técnica		1	2	1	2	1	2	
								Média
<i>GAPDH</i>								
	LMM	1	1	1	1	1	1	1
	LMM-Fe	2,72	3,04	1,51	1,08	1,35	1,43	1,85
	DIP50	2,13	1,88	1,69	1,57	1,76	1,74	1,79
	DIP100	2,25	2,71	4,26	3,42	2,06	2,56	2,88
	LMM+Fe	0,95	0,96	0,97	1,06	2,04	2,01	1,33
	LMM_bATf	1,18	1,41	1,40	1,58	1,75	1,85	1,53
	LMM_bHTf	0,94	0,83	0,91	0,74	0,89	0,78	0,85
	Fe- bATf	0,70	0,77	0,61	0,83	1,47	1,89	1,04
	Fe- bHTF	1,33	1,49	1,27	1,20	1,06	1,28	1,27
<i>vapA</i>								
	LMM	1	1	1	1	1	1	1
	LMM-Fe	3,06	4,24	4,56	3,35	3,88	4,41	3,92
	DIP50	6,70	5,67	6,68	6,12	6,29	6,29	6,29
	DIP100	9,22	13,60	27,21	25,25	28,54	20,76	20,76
	LMM+Fe	5,46	9,05	6,17	5,92	10,50	10,69	7,96
	LMM_bATf	3,06	3,63	2,84	2,61	3,04	3,04	3,04
	LMM_bHTf	2,88	2,86	3,06	2,88	2,92	2,92	2,92
	Fe- bATf	3,30	2,85	3,30	2,85	3,35	3,34	3,16
	Fe- bHTF	2,79	2,94	2,83	2,07	2,65	2,66	2,66
<i>rhbC</i>								
	LMM	1	1	1	1	1	1	1
	LMM-Fe	0,17	0,22	0,46	0,46	0,62	0,81	0,46
	DIP50	0,69	0,61	0,71	0,71	0,65	0,91	0,71
	DIP100	2,78	3,68	3,52	3,52	3,99	3,65	3,52
	LMM+Fe	4,46	4,46	4,13	3,42	8,03	2,27	4,46
	LMM_bATf	0,98	0,88	0,82	0,66	1,05	0,63	0,84
	LMM_bHTf	1,64	1,49	4,12	4,46	5,41	7,23	4,06
	Fe- bATf	0,40	0,31	0,34	0,33	0,23	0,40	0,34
	Fe- bHTF	0,54	0,55	0,41	0,67	0,54	0,54	0,54

Para análise estatística foi realizada a substituição de outliers, detectados pelo teste de Grubbs ($P < 0.05$), pela média dos demais ensaios.

APÊNDICE C – GRÁFICOS DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE GAPDH, *rhbC* e *vapA*

