



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Transcriptoma diferencial da infecção de linhagem celular de
macrófagos de murino por *Corynebacterium pseudotuberculosis***

ANA LÍDIA QUEIROZ CAVALCANTE

Belém – PA
Outubro 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Transcriptoma diferencial da infecção de linhagem celular de
macrófagos de murino por *Corynebacterium pseudotuberculosis***

ANA LÍDIA QUEIROZ CAVALCANTE

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFPA como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutora
em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos

Belém – PA

Outubro 2022

Transcriptoma diferencial da infecção de linhagem celular de macrófagos de murino por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

ANA LÍDIA QUEIROZ CAVALCANTE

Orientador:

Prof. Dr. Rommel Ramos

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Ribeiro Carneiro

Prof. Dr. Diego Assis das Graças

Prof. Dra. Edilene Oliveira da Silva

Prof. Dr. André Guimarães Maciel e Silva

Belém – PA

Outubro 2022

INSTITUIÇÕES

Este trabalho foi totalmente desenvolvido em

**Laboratório de Engenharia Biológica
Centro de Genômica e Biologia de Sistemas
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará**

**Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética
Seção de Meio Ambiente
Laboratório de Biologia Molecular
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
Instituto Evandro Chagas**

FONTE FINANCIADORA

Este trabalho foi totalmente financiado por

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPES**

DEDICATÓRIA

*Para o meu filho Guilherme, meu esposo
Raimundo e para minha mãe Mariana.*

AGRADECIMENTOS

No percurso deste trabalho muitos obstáculos foram enfrentados e não conseguiria vence-los sem a ajuda dos professores que disponibilizaram os seus laboratórios e conhecimentos para viabilizar esta tese. Obrigada ao professor Rommel Ramos que com muita paciência aceitou me orientar. Ele é um exemplo de professor que busca soluções para qualquer dificuldade, que não se conforma com os problemas. Sou grata em conhecer e contribuir em uma área na qual não imagina em trabalhar. Se não fosse pelo professor Rommel, nas suas aulas de Bioinformática, nas quais ainda estava na minha graduação, não optaria por conhecer o mundo das ômicas. Por isso, os frutos desta tese e da minha formação como doutora agradeço a este professor que tanto me ajudou. Não poderia esquecer também da professora Adriana Carneiro que contribuiu na minha formação profissional ainda na minha graduação em biologia até o mestrado. Sem perder o vínculo, ela ainda me ajudou durante o doutorado. Obrigada professora por contribuir com os seus conhecimentos para este trabalho. Agradeço aos professores Edivaldo de Oliveira e Ana Cecilia Cruz do Instituto Evandro Chagas que disponibilizaram a estrutura de seus laboratórios para que este estudo fosse realizado. E sem amigos também não conseguimos vencer as barreiras, por isso obrigada aos meus amigos que compartilharam durante o doutorado das dificuldades de realizar as etapas deste estudo. Obrigada Fabricio pelas conversas e ajuda, obrigada Edian pelas perturbações e ajuda, obrigada Carlos pela ajuda e obrigada a cada colega que tive oportunidade de conhecer no Laboratório de Engenharia Genômica e no Centro de Genômica e Biologia de Sistemas. Este doutorado também foi desenvolvido por vocês. Além disso, eu não conseguiria finalizar este doutorado sem a motivação da minha família, por isso agradeço a Deus por me conceder a família maravilhosa que me deu, pois sem ela não haveria razão para continuar. Obrigada a todos que permitiram e contribuíram para a finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A Linfadenite Caseosa e a relação patógeno-hospedeiro	15
1.1.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> : Aspectos Taxonômicos, morfológicos e bioquímicos	18
1.1.2 Transmissão.....	19
1.1.3 Fatores de virulência e Patogênese.....	20
1.1.4 Resposta imune a <i>C. pseudotuberculosis</i>	22
1.1.5 Diagnóstico.....	24
1.1.6 Prevalência	26
1.1.7 Prevenção e controle	27
1.1.8 Vacinação	28
1.2 Linhagem celular de macrófagos: RAW 264.7.....	29
1.3 Conjunto de genes de resposta do hospedeiro	30
1.3.1 Genes mediadores da inflamação	30
1.3.2 Genes estimulados por IFN	31
1.3.3 Genes ativadores da resposta imune.....	31
1.3.4 Genes que limitam a resposta imune	31
1.3.5 Genes adicionais envolvidos na resposta da célula hospedeira.....	32
1.4 Técnicas para obtenção de transcritos.....	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Obtenção da amostra contendo a <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
3.2 Cultivo e curva de crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
3.3 Cultivo da linhagem celular RAW 264.7.....	38
3.4 Infecção dos macrófagos por <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09.....	39
3.5 Extração e avaliação do RNA total das células RAW 264.7	40
3.6 Sequenciamento do mRNA das células RAW 264.7	42
3.7 Análise dos dados de transcriptoma	43

3.7.1 Análise funcional dos transcritos	44
4. RESULTADOS	44
4.1 Curva de Crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09	44
4.2 Avaliação da extração do RNA total	46
4.3 Avaliação da qualidade dos transcritos.....	46
4.4 Mapeamento e contagem das leituras	46
4.5 Genes Diferencialmente Expressos (DE).....	49
4.5.1 Genes induzidos e reprimidos	51
4.5.2 Análise dos Processos Biológicos dos genes induzidos e reprimidos.....	55
5. DISCUSSÃO	56
5.1 Genes induzidos com maiores níveis de expressão diferencial envolvidos com resposta imune do hospedeiro.	57
5.2 Genes reprimidos com maiores níveis de expressão diferencial envolvidos com resposta imune do hospedeiro.	59
5.3 Genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro.....	60
5.3.1 Genes induzidos	60
5.3.2 Genes reprimidos.....	62
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. APÊNDICE	77

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumins</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DCs	<i>Dendritic Cells</i>
DO	Densidade Óptica
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
HCl	Cloreto de Sódio
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IL	Interleucina
LC	Linfadenite Caseosa
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
Mtb	<i>Mycobacterium pseudotuberculosis</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
Sec	<i>Secretion</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STPKs	<i>Serine/Threonine Protein Kinases</i>
T3SS	<i>Type three Secretion System</i>
T7SS	<i>Type VII Secretion System</i>

Tat	<i>Twin-arginine translocator</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TRAFs	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors</i>
TSSs	<i>Transcription Start Sites</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTRs	<i>Untranslated Regions</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Principais linfonodos acometidos pela <i>C. pseudotuberculosis</i> . Fonte: adaptado de Pugh (2005).	16
Figura 2. Aspecto do pus na Linfadenite Caseosa superficial. Fonte: Hospital Veterinário CSTR – UFCG.....	16
Figura 3. Abscesso interno causado pela linfadenite caseosa em pulmão ovino. Fonte: Ovinopar: Almanaque trimestral (2018).....	17
Figura 4. Corte da capsula fibrosa que forma o abscesso. Fonte: Revista Veterinária em Foco – ULBRA.....	18
Figura 5. Esquema da evolução da patogenia da Linfadenite Caseosa. Fonte: Alves et al. (1997), adaptado de Batey (1986).	21
Figura 6. Retirada do material purulento do linfonodo pré-escapular do animal infectado. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.	36
Figura 7. Cultura de <i>C. pseudotuberculosis</i> em Agar sangue de carneiro. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.	37
Figura 8. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em meio de cultivo BHI caldo acrescido de Tween® 80. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.	37
Figura 9. Micrografias de microscópio óptico invertido das células RAW 264.7 após 24 horas de cultivo. (A) Células RAW 264.7 em lente de aumento 5x; (B) Células RAW 264.7 em lente de aumento 32x.	39
Figura 10. Macrófagos submetidos a agitação para sincronizar a infecção. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.	40
Figura 11. Fluxo de trabalho geral do <i>PureLink Mini Kit</i> para a extração do RNA total. ..	41
Figura 12. Fluxo de trabalho geral de preparação de amostra de sequenciamento de mRNA.	42
Figura 13. Fluxo de trabalho do pipeline miARma-Seq. Módulos principais são indicados por um fundo cinza. O arquivo de saída é indicado pelo fundo roxo. Adaptado de Andrés-León et al. (2016).....	44

Figura 14. Curva de crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09 medida em densidade óptica de 600 nm (DO _{600nm}) em horas.	45
Figura 15. Integridade do RNA total analisado das células infectadas e células controle. .	46
Figura 16. Distribuição das contagens antes e depois do processo de normalização das amostras tratadas e controle.....	48
Figura 17. Densidade da distribuição das contagens antes e depois do processo de normalização.....	48
Figura 18. Análise de Componentes Principais. As amostras dividem-se bidimensionalmente de acordo com as suas semelhanças. PC1 – Componente Principal 1; PC2 – Componente Principal 2.....	49
Figura 19. Genes diferencialmente expressos. logFC – razão entre infectado e controle em logaritmo. Média logCPM – média de contagens por milhão. A cor verde representa os genes DE não significativos e a cor vermelha os genes com expressão significativa. A linha vermelha indica o <i>2-fold changes</i>	50
Figura 20. <i>Heatmap</i> da semelhança entre as amostras com de acordo com a expressão de 250 mRNAs mais expressos. A cor verde representa genes menos expressos e a cor vermelha mais expresso nas amostras infectadas e controle.	51
Figura 21. Nuvem de palavras que representam os processos biológicos que os genes induzidos estão envolvidos.....	56
Figura 22. Nuvem de palavras que representam os processos biológicos que os genes reprimidos estão envolvidos.	56

TABELAS

Tabela 1. Valores de D.O e o número de células bacterianas/mL obtidos durante a curva de crescimento da <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09.	45
Tabela 2. Mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento.	47
Tabela 3. Genes induzidos nas células infectadas, com $\log_2FC \geq 1$	54
Tabela 4. Gene expresso nas células infectadas envolvido no estímulo e regulação de citocinas.....	55

RESUMO

As células hospedeiras eucarióticas estão sujeitas à infecção por diversos patógenos como bactérias e à medida que a infecção inicia é desencadeada uma cascata dinâmica de eventos que culmina com padrões alterados de expressão genética em ambos os organismos em interação. Para sobreviver dentro de um hospedeiro, os patógenos apresentam diversas alternativas para viabilizar seu crescimento por meio da replicação rápida. Com mecanismos tão diversos envolvidos em cada etapa da infecção no hospedeiro, a compreensão da resposta imune do hospedeiro frente a infecção é importante para o estudo da relação patógeno-hospedeiro. E estudos de RNA-Seq viabilizam os estudos de expressão diferencial em determinadas condições. Deste modo, neste estudo foi realizada análises de perfil de expressão diferencial de genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. As células utilizadas como modelo de hospedeiro foi a linhagem celular de murino RAW 264.7 fornecidas comercialmente pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem de *C. pseudotuberculosis* PA09 foi obtida por coleta de animal contaminado e diagnosticado com Linfadenite Caseosa. A infecção celular foi realizada durante três horas com MOI 5, posteriormente O RNA total da célula do hospedeiro foi extraído e avaliado quanto a integridade e quantidade. Através de um protocolo de preparo de biblioteca para mRNA foi sequenciado, pela plataforma Illumina, o RNA das amostras em triplicata biológica. Foram realizadas nos dados do sequenciamento análises de qualidade, quantidade e expressão gênica diferencial pelo *pipeline* do miARma-Seq. E as análises funcionais foram realizadas por ontologias através do programa *Go feat*. Foram obtidos 8.003 genes diferencialmente expressos (DE), destes 529 genes foram induzidos e 98 reprimidos. O maior nível de expressão induzida foi do gene *Csf3*, que codifica uma citocina importante no estímulo a resposta imune do hospedeiro. Além disso, outro gene que se destacou foi *Epha2*, que possivelmente pode estar relacionado com a sobrevivência de *C. pseudotuberculosis* na fase crônica da infecção. Portanto, a avaliação de genes DE no processo de resposta imune do hospedeiro pode colaborar para novos *insights* na interação *C. pseudotuberculosis*-hospedeiro, o que permite um estudo mais direcionado em alvos gênicos para a obtenção de tratamento como vacinas.

Palavras-chave: Macrófagos. Expressão Diferencial. Linfadenite Caseosa.

ABSTRACT

Eukaryotic host cells are subject to infection by several pathogens such as bacteria, and as infection begins, a dynamic cascade of events is triggered that culminates in altered patterns of gene expression in both interacting organisms. To survive within a host, pathogens have several alternatives to enable their growth through rapid replication. With such diverse mechanisms involved in each stage of host infection, understanding the host's immune response to infection is important for the study of the host-pathogen relationship. And RNA-Seq studies enable differential expression studies under certain conditions. Thus, in this study, analysis of the differential expression profile of genes involved in the host's immune response to infection by *Corynebacterium pseudotuberculosis* was performed. The cells used as a host model were the murine cell line RAW 264.7 commercially supplied by the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). The strain of *C. pseudotuberculosis* PA09 was obtained from a contaminated animal diagnosed with caseous lymphadenitis. Cellular infection was performed for three hours with MOI 5, then total RNA from the host cell was extracted and evaluated for integrity and quantity. Through an mRNA library preparation protocol, the RNA of the biological triplicate samples was sequenced by the Illumina platform. Analyzes of quality, quantity and differential gene expression through the miARma-Seq pipeline were performed on the sequencing data. And the functional analyzes were performed by ontologies through the *Go feat* program. A total of 8,003 differentially expressed (DE) genes were obtained, of which 529 genes were induced and 98 repressed. The highest level of induced expression was the *Csf3* gene, which encodes an important cytokine in stimulating the host's immune response. Furthermore, another gene that stood out was *Epha2*, which could possibly be related to the survival of *C. pseudotuberculosis* in the chronic phase of the infection. Therefore, the evaluation of DE genes in the host immune response process may contribute to new insights into the *C. pseudotuberculosis*-host interaction, which allows for a more focused study of gene targets for obtaining treatment such as vaccines.

Keywords: Macrophages. Differential Expression. Caseous lymphadenitis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Linfadenite Caseosa e a relação patógeno-hospedeiro

A linfadenite caseosa (LC), também como pseudotuberculose ou “mal do carço”, é uma doença infectocontagiosa, de caráter crônico e de ocorrência mundial, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, acometendo ovinos e caprinos (Alves et al., 2007). Apesar de apresentar baixa mortalidade, a enfermidade está associada principalmente às elevadas perdas econômicas, por comprometer a produção de leite, carne e carcaça (de Sá Guimarães et al., 2011) e por causar menor eficiência reprodutiva nos animais acometidos (Umer et al., 2017).

C. pseudotuberculosis possui uma ampla variedade de hospedeiros e induz infecção clínica em bovinos, porcos, cavalos, veados, camelos e muitos animais de laboratório (Moore et al., 2010). Da mesma forma, causa distúrbios reprodutivos, como aborto, natimortalidade e infecção neonatal em ovelhas (Dennis & Bamford, 1966; Addo, 1979; Alonso et al., 1992) e em carneiros, orquite supurativa (Ladds, 1993). Williamson & Nairn (1980) também relataram artrite, bursite e mastite em ovelhas (Radostits et al., 2007) e finalmente toxemia que leva à morte rápida em cordeiros e cabritos neonatais desafiados experimentalmente. Do ponto de vista zoonótico, os humanos raramente são afetados, alguns casos de infecções foram documentados em relação aos possíveis riscos de infecção em médicos veterinários e auxiliares, bem como em especialistas em fazendas (Peel et al., 1997).

Esta doença apresenta-se de duas formas clínicas, a externa ou superficial e a interna ou visceral, em que a formação de abscessos é comum as duas. A forma externa, caracteriza-se por formações de abscessos nos linfonodos superficiais, principalmente nos parotídeos, retrofaríngeos, mandibular, pré-escapular, pré-femoral, poplíteo e inguinal superficial (Umer et al., 2017) (Figura 1). Os linfonodos afetados, apresentam um aumento de volume, formando um abscesso contendo pus de coloração amarelo esverdeado e consistência viscosa (Veschi, 2011) (Figura 2). Estes linfonodos são sensíveis à palpação e tornam-se flutuantes à medida que a doença evolui (Radostits et al., 2002).

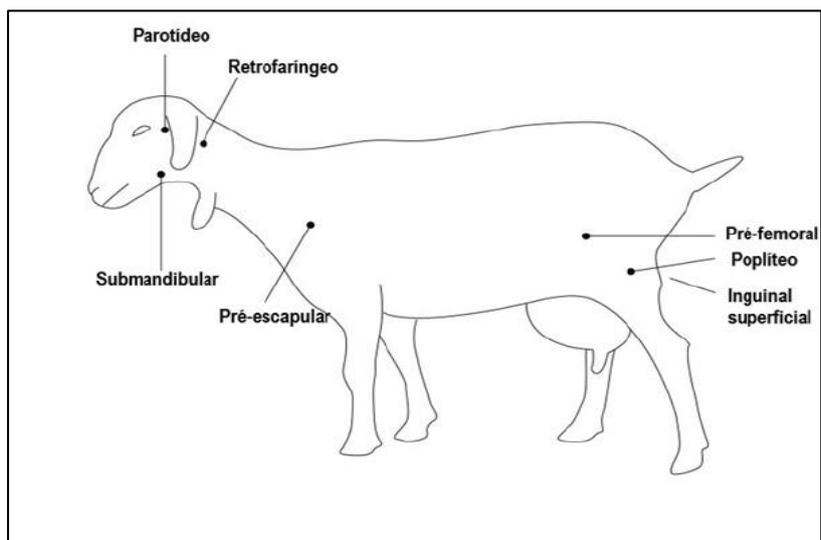


Figura 1. Principais linfonodos acometidos pela *C. pseudotuberculosis*. Fonte: adaptado de Pugh (2005).



Figura 2. Aspecto do pus na Linfadenite Caseosa superficial. Fonte: Hospital Veterinário CSTR – UFCG.

Na forma visceral, também conhecida como “síndrome da ovelha magra”, a infecção localiza-se nos gânglios linfáticos associados as vísceras (Figura 3), como os rins, fígado,

baço, e quando acometem os pulmões, os animais podem causar emagrecimento progressivo, dispneia ou taquipneia e tosse crônica (Alves et al., 2007; Souza et al., 2011).



Figura 3. Abscesso interno causado pela linfadenite caseosa em pulmão ovino. Fonte: Ovinopar: Almanaque trimestral (2018).

Estudos microscópios indicam que a lesão tem início como um pequeno conjunto de células epitelióides, mas logo em seguida é substituída por uma necrose caseosa, que passa a ser a característica predominante da doença. A massa caseosa central logo é circundada por uma delgada camada de células epitelióides mescladas com linfócitos, e a essa camada é acrescentada uma camada reforço externa de tecido conjuntivo fibroso. À medida que a lesão vai crescendo, as camadas reativas epitelióides e fibrosa sofrem necrose; a camada epitelióide morre primeiro. Enquanto a camada fibrosa ainda permanece visível, formam-se novas camadas externas a esta, que por sua vez também vão necrosando sucessivamente. O resultado é uma massa concêntrica laminada, esférica, e com um aspecto de cebola cortada, que pode atingir um diâmetro de vários centímetros (Jones et al., 2000) (Figura 4).

A distribuição mundial, a dificuldade no tratamento e ausência de vacinas eficazes provoca perdas econômicas consideráveis na ovinocaprinocultura, o que justifica a necessidade de estudos mais aprofundados sobre *C. pseudotuberculosis*.



Figura 4. Corte da capsula fibrosa que forma o abscesso. Fonte: Revista Veterinária em Foco – ULBRA.

1.1.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Aspectos Taxonômicos, morfológicos e bioquímicos

O gênero *Corynebacterium* pertence à família *Corynebacteriaceae*, na qual está classificada no filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria* e ordem *Corynebacteriales* (Clavel et al., 2014; Lehmann & Neumann, 1907). Foi sugerida uma relação filogenética próxima entre *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, devido estes microrganismos serem os únicos entre as corinebactérias a produzirem potentes exotoxinas, a toxina difteria e fosfolipase D, que desempenham papéis significativos na virulência (Holmes, 2000; Dorella et al., 2006).

C. pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular anaeróbio facultativo, não possui capsula, não esporula, é imóvel e possui fímbrias. Apresenta formas pleomórficas que variam desde cocóides a bastões filamentosos, medindo de 0,5 a 0,6 µm por 1,0 a 3,0 µm de tamanho. É uma bactéria mesófila, com condições ótimas de crescimento a 37°C, em pH entre 7,0 e 7,2 (Merchant & Packer, 1967; Hard, 1969; Buxton & Fraser, 1977; Connor et al., 2000; Selim, 2001).

O crescimento na superfície de Agar BHI é inicialmente espaçado e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme

alaranjado. Em meio líquido, desenvolve-se como depósitos granulares, com uma película na superfície (Dorella et al., 2006).

A parede celular de *C. pseudotuberculosis* contém peptidoglicano, que produz o ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), o qual está relacionado à resistência da parede contra a maioria das peptidases, e o ácido micólico, além de apresentar os açúcares arabinose e galactose em grande quantidade (Dorella et al., 2006). A produção de ácido ocorre a partir de fontes de carbono incluindo glicose, frutose, maltose, manose e sacarose, bem como a não produção de gás (Holt et al., 1994). Além disso, apresenta peptidoglicano, arabinogalactanos e ácidos micólicos na parede celular e alto conteúdo G+C (46-74%) no genoma (Songer, 2005).

C. pseudotuberculosis é catalase, urease e fosfolipase D positiva, oxidase negativa e beta-hemolítica (Muckle & Gyles, 1982). A partir da redução de nitrato a nitrito, foi classificado dois biovariedades de *C. pseudotuberculosis*: tipo I ou biovar *ovis*, isolados de ovino e caprino, são nitrato negativo; tipo II ou biovar *equi*, isolados de equino e bovino, são nitrato positivo (Baird & Fontaine, 2007).

1.1.2 Transmissão

Várias vias de inoculação como oral, intranasal, intradérmica, intratraqueal, intravenosa ou intravaginal já foram testadas com sucesso em experimentos, embora os principais determinantes da severidade da enfermidade na infecção experimental são a dose do inóculo e a via de inoculação (Brown & Olander, 1987). Na ocorrência natural da doença, esses parâmetros não são reconhecidos e a transmissão da LC ocorre fundamentalmente através da contaminação de feridas cutâneas superficiais realizadas durante a tosquia, marcação de orelha, castração, luta entre rebanhos ou fricção contra superfícies contaminadas (Ayers, 1977; Williamson, 2001; Othman et al., 2014; Latif et al., 2015).

Animais infectados são considerados uma possível fonte de contaminação, pois podem liberar um número imenso de organismos selvagens por meio de secreção purulenta de abscessos rachados ou por tosse com secreção de lesões presentes nos pulmões (Pepin et al., 1994; Baird & Fontaine, 2007). Outros animais podem ficar desprotegidos por meio do contato direto com animais infectados por meio de equipamentos e meio ambiente contaminados. *C. pseudotuberculosis* demonstrou sobreviver por um longo tempo em

fômites ou diferentes materiais naturais (Nairn & Robertson, 1974; Augustine & Renshaw, 1986).

Cabras com mucosa bucal traumatizada têm mais chances de entrar em contato com a bactéria por alimentos contaminados (Brown & Olander, 1987). Devido à alta prevalência de lesões torácicas e pulmonares da forma visceral da LC, é possível a transmissão aérea. No entanto, a disseminação das lesões pulmonares demonstra uma disseminação hematogênica ou linfogênica ao invés de erógena (Augustine & Renshaw, 1986). No entanto, animais com lesões pulmonares desempenham um papel fundamental na transmissão da bactéria, da mesma forma, eles podem aproximar as feridas da pele em outros animais (Pepin, Paton, et al., 1994). As investigações por parte de insetos e artrópodes que servem como vetores para *C. pseudotuberculosis* são inconclusivas (Brown & Olander, 1987).

1.1.3 Fatores de virulência e Patogênese

Dois principais fatores de virulência foram identificados para o estabelecimento da LC, a fosfolipase D e ácidos micólicos (Baird & Fontaine, 2007). A fosfolipase D é enzima hidrolisante de glicol-fosfolípido responsável por muitos processos biológicos, como dermo-necrose (Brogden et al., 1990; CA Muckle & Gyles, 1986; Songer, 1997), lise sinérgica letal de eritrócitos na presença de um fator extracelular *Rhodococcus equi* (Fraser, 1961).

Jolly (1965) relatou que o PLD aumentou a permeabilidade da parede vascular, causou extravasamento de plasma dos vasos sanguíneos pela hidrólise da esfingomielina nas membranas do endotélio. A patogênese pode ser auxiliada por este efeito e permite que a bactéria migre do local da infecção para os linfonodos ao redor das regiões periféricas (Brown & Olander, 1987; Pepin et al., 1994a).

A quimiotaxia em neutrófilos são prejudicados por PLD, reduzindo assim as chances de fagocitose durante o estágio inicial da infecção (Tashjian & Campbell, 1983; Yozwiak & Songer, 1993; Pepin et al., 1994b). Isso pode estar associado à patogênese por drenagem linfática para os tecidos (Batey, 1986). Pode auxiliar o microrganismo no início das infecções e também é responsável pela criação de vias para o sistema imunológico (Tashjian & Campbell, 1983; Yozwiak & Songer, 1993; Pepin et al., 1994b). *C. pseudotuberculosis* tem a capacidade de se replicar dentro dos macrófagos e ser liberado, alguns outros

pesquisadores recomendaram que a PLD pode desempenhar um papel importante no fagossoma e causar a morte de macrófagos (Pepin et al., 1994a; McKean et al., 2007).

A parede celular de *C. pseudotuberculosis* é revestida por um ácido micólico ceroso que desempenha um papel importante na patogênese. Este revestimento protetor tem propriedades de citotoxina, bem como resistência mecânica que desempenha um papel vital na patogenicidade do organismo (Tashjian & Campbell, 1983; Baird & Fontaine, 2007). Segundo alguns pesquisadores, a camada de ácido micólico tem a capacidade de permitir que *C. pseudotuberculosis* sobreviva mesmo em condições extremas por um longo período de tempo no ambiente; características semelhantes também foram observadas em *Actinomycetes* e *Mycobacterium* (Paton et al., 2002; Baird & Fontaine, 2007).

A infecção pela *C. pseudotuberculosis* começa com a penetração no hospedeiro, que normalmente ocorre através da mucosa oral, nasal e através de feridas cutâneas, e sua disseminação ocorre livremente ou dentro de macrófagos, através do sistema linfático aferente aos linfonodos locais e alguns órgãos internos e viscerais, onde os abscessos caseosos se desenvolvem e ocorre a necrose. As lesões são consequências da multiplicação bacteriana dentro das células (intracelular), que é precedida pela morte das células do hospedeiro (Jolly, 1965; Hard, 1969) (Figura 5). O tamanho da lesão talvez flutue com a concentração inicial do patógeno, a taxa de multiplicação do microrganismo e a disponibilidade das células de defesa para a lesão do hospedeiro (Batey, 1986).

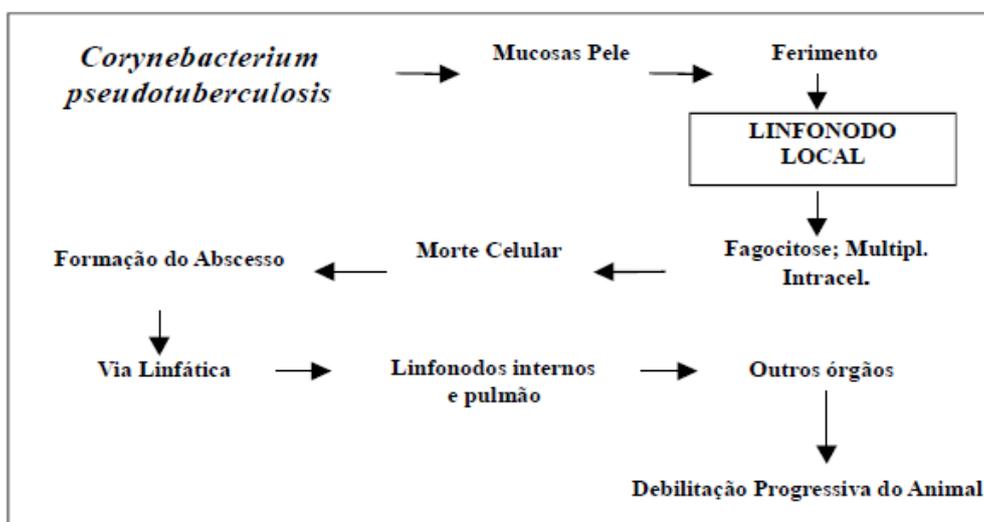


Figura 5. Esquema da evolução da patologia da Linfadenite Caseosa. Fonte: Alves et al. (1997), adaptado de Batey (1986).

1.1.4 Resposta imune a *C. pseudotuberculosis*

O papel do sistema imune inato na infecção por *C. pseudotuberculosis* ainda não é bem compreendido, todavia já se sabe do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e INF- γ como também a presença de neutrófilos, células NK e macrófagos na fase inicial da infecção (Stefańska et al., 2010; Pépin et al., 1997). Algumas células são carregadas logo após a infecção, principalmente neutrófilos e posteriormente macrófagos. Essas células fazem parte do mecanismo de ação da resposta imune inata, ocorrendo nos primeiros dias da infecção, e produzem sinalizações para o desenvolvimento da resposta adaptativa (Bastos, 2012; Pepin et al., 1999).

A resposta imune inata inicia-se depois do reconhecimento de estruturas microbianas conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Esse reconhecimento é feito por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes em células como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais, e células endoteliais do hospedeiro (Levitz & Golenbock, 2012). No grupo dos PRRs existem os receptores *Toll-like* (TLRs) que já foram implicados no reconhecimento de PAMPs de Micobactérias (Taciak et al., 2018; Simmons et al., 2010; Jo, 2008; Ferwerda et al., 2007; Akira et al., 2006). Os TLRs 2,4 e 9 são capazes de identificar PAMPs do *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* resultando em um direcionamento da imunidade adaptativa (Thirunavukkarasu et al., 2013; Carvalho et al., 2011; Tapping & Tobias, 2003).

Após o reconhecimento e a proliferação do patógeno no interior das células do hospedeiro, ocorre o desenvolvimento de granuloma e caracterização da maturação e persistência do granuloma, que libera novas bactérias e causa necrose. Os granulomas são formas de inflamação, no qual sua formação é uma resposta imune inata para separar substâncias insolúveis evitando a propagação para outro local. Eles possuem resposta linfocitária associada com a arquitetura e organização e mostra que as subpopulações presentes desempenham funções significativas no processo da doença. A polarização de macrófagos é um importante processo na formação de granulomas. Os macrófagos ativados expressam MHC classe II, ligando a receptores *Toll-like* e IFN- γ , promovendo resposta Th1 (Marino et al., 2015; Walker et al., 1991).

Além disso, a imunidade contra *C. pseudotuberculosis* envolve respostas imunes celulares e humorais. Por ser uma infecção intracelular facultativa, possui uma maior

resposta imune celular, onde as células T produzem IFN- γ , e outras citocinas importantes para o controle da infecção. Na resposta imune humoral, observa-se que a partir de 6 a 11 dias de infecção, a produção de anticorpos é importante para evitar a disseminação da bactéria, a presença de citocinas IFN- γ , como resposta primária é importante para evitar a propagação do agente. A partir do dia 16 estabelece-se uma forte resposta secundária, que diminui entre os dias 42 a 56 (Paule et al., 2003). Estudos revelam que durante a infecção por este microrganismo há uma forte resposta humoral, apesar dessa resposta não ser capaz de eliminar a infecção (Michael C. Fontaine et al., 2006).

Estudos revelam a grande importância das citocinas pró-inflamatórias INF- γ e TNF- α , sobretudo no local da infecção (Pépin et al., 1997), sendo que o TNF- α apresenta papel crucial na fase primária do processo infeccioso (Lan, 1998). Pesquisas realizadas por Pépin e colaboradores (1997) mostraram que a estimulação de IFN- γ e a formação de granulomas seriam independentes do fator de virulência PLD, concluindo também que existe uma ligação entre a formação de granulomas e a expressão de algumas citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL1- β , IL-2, IL-4) importantes na limitação da disseminação do patógeno.

MACRÓFAGOS

O macrófago é uma importante célula do sistema imunitário, proveniente da linhagem mieloide do sistema hematopoiético, tendo como precursor o monócito (Geissmann et al., 2010). É a principal célula do sistema fagocitário mononuclear e constitui um dos principais componentes do sistema imune inato contra microrganismos, através do reconhecimento de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos), que interagem com receptores específicos PRRs (Murray & Wynn, 2011). Quando ativados apresentam diversas funções, como atividade metabólica e fagocítica, tendo maior capacidade de endocitose. Na ativação, convertem o oxigênio em derivados reativos do oxigênio (ROS), que destroem os microrganismos.

Os macrófagos estão envolvidos na reparação tecidual, pois quando ativados produzem fatores de crescimento para fibroblastos e células endoteliais que participam na remodelagem dos tecidos, remoção de células lesadas, estando envolvidos em todas as fases da resposta imune (T. Wynn & Barron, 2010). Os macrófagos apresentam papel de destaque

na patogenicidade da infecção por *C. pseudotuberculosis*, fornecendo um nicho intracelular para a sobrevivência e multiplicação do patógeno, onde ocorre a evasão do sistema imune por inibição da formação do fagolisossomo, resultando em multiplicação da bactéria e morte celular. Porém, estudos mostram que a fagocitose do agente pode variar de acordo com a cepa (I Stefańska et al., 2010). Quando ativadas classicamente são chamadas de M1, participando da resposta imune Th1. Essa ativação pode ocorrer na presença de IFN- γ , e fator de necrose tumoral (TNF), estimulando a fagocitose para eliminar o patógeno. Na ativação alternativa, células M2 referem-se a várias formas de macrófagos, após exposição à IL-4, IL-13 e IL-10. As células M2 produzem citocinas inflamatórias em menores níveis, secretam moléculas anti-inflamatórias, como TGF- β , induzindo resposta imune Th2, diminuindo a fagocitose e capacidade de eliminar o patógeno (Jenkins et al., 2011).

1.1.5 Diagnóstico

A identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho são os métodos mais efetivos para o controle da LC. Essa identificação pode ser realizada, inicialmente, através do diagnóstico clínico, no qual se visualiza a presença de abscessos nos linfonodos superficiais do animal. Além deste, pode ser realizado o isolamento e a identificação do agente através do exame bacteriológico do material caseoso drenado a partir dos abscessos (Alves et al., 2007). O isolamento bacteriano é importante para distinguir o agente causador da LC de outras bactérias. Por exemplo, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus licheniformis* também podem ser vistos em abscessos (Shin et al., 2010; Pekelder, 2003).

Uma radiografia torácica pode revelar massas dentro do parênquima pulmonar e nódulos linfáticos em animais com problemas respiratórios, que também pode ser confirmado pela cultura de lavagens traqueais (Pugh & Baird, 2012). Para a identificação citológica do microrganismo, pode-se usar a coloração de Gram e Giemsa. Uma vez que a coloração de Gram não é mencionada principalmente para a coloração de tecidos, a cor azulada é assumida por *C. pseudotuberculosis* e uma cor avermelhada aparece no material celular e inflamatório dos linfonodos aspirados (Radostits et al., 2002).

Testes diretos e indiretos para detecção de *C. pseudotuberculosis* já foram propostos, como teste de fixação de complemento, teste de inibição de hemólise sinérgica, ensaio de

microaglutinação, ELISA baseado em antígeno PLD (Dercksen et al., 2000). A partir de culturas e amostras de pus de animais infectados com LC, o ensaio Multiplex PCR (mPCR) fornece uma ferramenta de identificação confiável, eficaz e rápida para *C. pseudotuberculosis* (Pacheco et al., 2007). Um marcador de imunidade mediada por células para determinação de IFN- γ por ELISA tem sido utilizado para o diagnóstico de infecção por *C. pseudotuberculosis*, apresentando sensibilidade de 91% e especificidade de 98%, demonstrando seu potencial para uso em programas de erradicação de LC (Menzies et al., 2004). O teste IFN- γ por ELISA é mais sensível na identificação de infecção precoce em cabras em comparação com o ELISA de anticorpo normal, e também não parece ser influenciado pela vacinação (Menzies et al., 2004).

Métodos de tipagem molecular têm sido usados para decidir o grau de parentesco entre muitas espécies distintas de Corinebactérias, incluindo hibridização de ácido nucleico, análise da sequência do gene 16S rRNA e polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição do gene 16S rRNA (RFLP) (Pavan et al., 2012; Bjorkroth et al., 1999), RFLP de DNA cromossômico (Costa et al., 1998), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (Connor et al., 2000, 2007) e polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD) (Foley et al., 2004; Stefańska et al., 2008).

A PFGE foi utilizada para descrever 50 cepas de *C. pseudotuberculosis* isoladas de pequenos ruminantes no Reino Unido (Connor et al., 2000). Foram encontrados seis “*pulsetypes*”, o que possibilitou determinar a origem do surto de LC. Seja como for, em um relatório de 36 amostras de ovelhas e 6 amostras de cabras da Austrália, Canadá, Holanda e Irlanda do Norte, a mesma equipe de pesquisa estudou quatro diferentes “*pulsetypes*” com a conclusão de que essas cepas de *C. pseudotuberculosis*, ambas de cabra e ovelhas, são muito homogêneas (Connor et al., 2007). Os RAPDs foram valiosos em um estudo de 54 cepas de *C. pseudotuberculosis* isoladas de cavalos em quatro estados dos EUA, reconhecendo 10 genótipos diferentes (Foley et al., 2004). Além disso, RAPDs feitos com outros iniciadores definiram 8 genótipos entre 61 cepas de *C. pseudotuberculosis* identificadas em cabras na Polônia (Stefańska et al., 2008).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), usada para isolar *C. pseudotuberculosis*, é uma opção mais rápida e específica em comparação com os métodos de diagnóstico convencionais (Çetinkaya et al., 2002). Numerosas toxinas bacterianas e fatores de virulência levaram a uma maior compreensão dos mecanismos patogênicos que levam à

doença e sua propagação (Pavan et al., 2012). O gene *rpoB* supostamente substitui ou complementa os genes 16S rRNA para análise filogenética, pois *rpoB* é essencialmente mais polimórfico em comparação com o gene 16S rRNA para o gênero *Corynebacterium* (Khamis et al., 2004). A amplificação dos genes 16S rRNA, *pld* e *rpoB* por PCR multiplex (mPCR), teve sensibilidade de 94,6%, tanto para isolados de *C. pseudotuberculosis* quanto para manifestação clínica (Pacheco et al., 2007). Ajuda a identificar *C. pseudotuberculosis* de outros patógenos, principalmente *Corynebacterium ulcerans* (Pacheco et al., 2007). Um novo ensaio de PCR quadruplex para identificação de *C. pseudotuberculosis* em nível de espécie e biovar foi desenvolvido por Almeida e colaboradores (2017). O gene *narG* da nitrato redutase foi combinado no ensaio junto com os genes 16S rRNA, *rpoB* e *pld* para melhorar o diagnóstico de LC em nível de biovar por PCR multiplex.

Recentemente, laboratórios de microbiologia clínica estão familiarizando-se com uma mudança de ferramentas clássicas para novas ferramentas de diagnóstico como PCR em tempo real, sequenciamento e identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF) (Gonçalves et al., 2014), que, devido à redução de custos, pode preferir a utilização de testes moleculares aos bioquímicos. Além disso, os iniciadores de oligonucleotídeos são executados para direcionar o gene da prolina iminopeptidase (PIP), que é o gene mais conservado para a determinação de cepas patogênicas (D'Afonseca et al., 2010).

1.1.6 Prevalência

A LC é a doença mais prevalente e com distribuição mundial (de Sá Guimarães et al., 2011). No Brasil, a taxa de infecção de LC em rebanhos caprinos foi observada em 31,4% (Seyffert et al., 2010), mas em um estudo recente, a prevalência de LC foi calculada em rebanhos caprinos brasileiros com 25,33% (da Costa Barnabé et al., 2020). A prevalência média de LC foi estimada na Austrália em 26% em pequenos ruminantes (Paton et al., 2003). No Canadá, a prevalência de LC foi de 36% (Arsenault et al., 2003). A prevalência de LC em caprinos foi registrada em 2,50% na Venezuela (Chirino-Zárraga et al., 2006). A prevalência geral da infecção por LC em cabras mexicanas foi medida em 35,63% (Guerrero et al., 2018).

Na Etiópia, a prevalência de LC foi examinada com 10,68% em cabras (Abebe & Sisay Tessema, 2015). No entanto, um estudo recente realizado na Etiópia, indica que uma

prevalência de LC em cabras foi monitorada com 18,8% (Yitagesu et al., 2020). Na Argélia, a prevalência de LC em cabras e ovelhas foi observada em 1,6 e 8,9%, respectivamente (Alloui et al., 2011). No Egito, a prevalência de LC em cabras e ovelhas foi registrada em 19,23% (Al-Gaabary et al., 2009). A prevalência de LC em pequenos ruminantes foi monitorada em 45% no Reino Unido (Binns et al., 2002). Uma prevalência de LC de 37,9% em cabras foi observada na Itália (Minozzi et al., 2016).

Na Espanha, a prevalência de LC em pequenos ruminantes causada por *C. pseudotuberculosis* foi detectada em 26,3% (de la Fuente et al., 2017). A frequência de surto de LC foi registrada em 11,1% na Malásia (Osman et al., 2012). Na Tailândia, a prevalência de LC em rebanhos caprinos foi de 5,06% (Thongkwow et al., 2019). Na Índia, a prevalência geral de LC em cabras foi observada em 14,44% (Gururaj et al., 2018). A prevalência de LC causado por *C. pseudotuberculosis* em cabras foi encontrada em 39,22% na China (Hexian Li et al., 2018). Na Coreia, a prevalência de CLA em cabras foi estimada em 7,3% (Jung et al., 2015).

1.1.7 Prevenção e controle

A drenagem dos abscessos é acompanhada de limpeza e cauterização química, normalmente com 10% de iodo, ou retirada dos linfonodos superficiais infectados nos animais afetados (Nozaki et al., 2000). Mesmo sendo uma importante medida de controle, essa técnica pode não ser eficaz como pretendido devido aos abscessos internos na LC. A drenagem do abscesso deve ser realizada de forma a evitar contaminação ambiental, com adequada desinfecção do material cirúrgico durante o procedimento.

A antibioticoterapia é outra opção de tratamento pouco eficaz, apesar de *C. pseudotuberculosis* ser sensível a quase todos os antibióticos testados *in vitro*. A localização intracelular de *C. pseudotuberculosis*, juntamente com a formação de biofilme em infecções naturais torna os antimicrobianos ineficientes, diminuindo a eficácia do medicamento (Olson et al., 2002; Brown & Olander, 1987). A antibioticoterapia é uma solução inviável para o controle de doenças em nível de rebanho devido à sua falta de eficácia e alto custo.

Um programa eficaz de controle do LC deve ser baseado na avaliação clínica e na sorologia intermitente dos animais do rebanho, que incorpora os animais adquiridos recentemente e os demais que retornam ao rebanho, separando os que apresentam sinais

clínicos ou sorológicos positivos (Aftabuzzaman, 2021). Um animal uma vez infectado quase não elimina *C. pseudotuberculosis* devido à sua má resposta ao tratamento, sua capacidade de adaptação no meio ambiente e as limitações na detecção da presença de abscessos internos em animais infectados subclínicamente no caso de LC (Lopes Bastos, 2012; L. H. Williamson, 2001).

A principal via de infecção em um rebanho é a entrada de animais infectados, com ou sem sinais clínicos, resultando em alta incidência de abscessos após 2 ou 3 anos (Al-Harbi, 2011). Os animais infectados contaminam o solo, água, pastagens, rações e instalações com pus de drenagem de abscessos, secreções nasais e fezes de animais infectados. Isso enfatiza a importância da implementação de procedimentos de biossegurança no rebanho, principalmente quando novos animais são introduzidos (Aftabuzzaman, 2021) .

As cabras são infectadas principalmente por contaminação de feridas superficiais, que podem ocorrer durante a castração e marcação das orelhas, ou por lesões no corpo do animal causadas por outros eventos traumáticos (Dorella et al., 2006). Devem ser tomadas medidas para diminuir o risco de infecção, por exemplo, o uso de cercas de arame liso, desinfecção de equipamentos cirúrgicos e instrumentos de marcação auricular, o uso sistemático de agulhas individuais descartáveis (Aftabuzzaman, 2021).

1.1.8 Vacinação

Foi demonstrado que a imunização minimiza a disseminação da infecção e leva a um declínio gradual na prevalência, mas nenhuma das vacinas LC atualmente licenciadas oferece proteção total contra *C. pseudotuberculosis* (Fontaine & Baird, 2008; Paton et al., 2003). A vacinação deve ser aplicada quando houver alta prevalência de infecção (Paton et al., 2003). Geralmente, é importante ter um esquema de vacinação definido para o rebanho saudável, porém a proteção conferida pela vacinação é apenas parcial no desenvolvimento de abscessos externos quanto internos (L. H. Williamson, 2001).

O principal componente de *C. pseudotuberculosis* usado na formulação de vacinas é o PLD. A base de seu uso é o bom índice de proteção obtido após a imunização de caprinos com essa toxina. A maioria das vacinas comerciais para *C. pseudotuberculosis* usa PLD inativada relacionada a antígenos de outros patógenos, como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium novyi* e *Clostridium chauvoei*. A vacina Glanvac® 6 (Zoetis,

Austrália) é baseada nesta formulação e é aprovada para uso em cabras em vários países (de Pinho et al, 2021). A vacina Biodectin® também está licenciada no Brasil para uso em cabras. A vacinação de caprinos com Glanvac® resultou em proteção contra infecção por *C. pseudotuberculosis*, evidenciada pela redução do número de lesões (de Pinho et al., 2021).

A outra vacina comercial avaliada, Caseous DT® (Colorado Serum Co. Canadá), tem duas formulações, uma que contém toxinas clostridiais e outra que é uma combinação de *C. pseudotuberculosis* e toxinas clostridiais (Paton et al., 2003; Piontkowski & Shivvers, 1998; Stanford et al., 1998). Os resultados preliminares mostram que a segunda formulação oferece melhor proteção contra a infecção do que a primeira, diminuindo o número de lesões internas e externas (Piontkowski & Shivvers, 1998).

A utilização de toxinas PLD para a imunização de cabras adultas pode ter alguns efeitos colaterais, incluindo diminuição na produção de leite, febre, edema ventral e ataxia, mas nenhuma exposição em animais jovens. Portanto, ao prescrever a vacina para cabras, os profissionais da fazenda devem estar cientes das limitações da vacina e notificar os proprietários dos potenciais efeitos colaterais da vacina (Williamson, 2001).

1.2 Linhagem celular de macrófagos: RAW 264.7

Linhagens celulares estabelecidas são amplamente utilizadas em todo o mundo para análises *in vitro* e *in vivo*. A razão para isso é a fonte ilimitada de células com genótipo e fenótipo semelhantes através de passagens consecutivas. No entanto, nos últimos anos, os pesquisadores são mais cautelosos na interpretação dos dados obtidos a partir de experimentos realizados apenas em linhagens celulares. A questão mais interessante são as características das células e sua comparabilidade e estabilidade entre vários laboratórios e até mesmo várias passagens. Identificação errônea de linhagem celular, contaminação por *Mycoplasma* ou mudança genotípica e fenotípica quando cultivadas por tempo prolongado, são questões importantes muitas vezes perdidas em artigos de pesquisa (Taciak et al., 2018).

As células RAW 264.7 são semelhantes a monócitos/macrófagos e originais da linhagem celular transformada pelo vírus de leucemia de Abelson, derivada de camundongos BALB/c. Estas células estão sendo descritas como um modelo apropriado de macrófagos, que são capazes de realizar pinocitose e fagocitose, e após estimulação com LPS, as células RAW 264.7 aumentam a produção de óxido nítrico (NO) e aumentam a fagocitose. Além

disso, essas células são capazes de matar as células-alvo por citotoxicidade dependente de anticorpos (Fuentes et al., 2014).

A linhagem celular RAW 264.7 foi avaliada quanto ao fenótipo (expressão de genes característicos de macrófagos e marcadores de superfície) e as características funcionais (fagocitose e produção de NO) e foi observado a estabilidade desses fatores através das passagens celulares (Taciak et al., 2018).

1.3 Conjunto de genes de resposta do hospedeiro

As respostas das células hospedeiras aos microrganismos patogênicos estão entre os exemplos mais bem estudados de respostas celulares a estímulos externos. As alterações fenotípicas induzidas por patógenos nas células do hospedeiro são frequentemente acompanhadas por mudanças marcantes na expressão gênica (Jenner & Young, 2005).

Macrófagos, neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) respondem a uma ampla gama de estímulos bacterianos com programas comuns de ativação transcricional. Da mesma forma, as células dendríticas (DCs) compartilham uma resposta transcricional comum a patógenos tão diversos como *Escherichia coli*, *Candida albicans* e o vírus influenza (Huang et al., 2001).

As células imunes do hospedeiro também regulam a expressão gênica de uma maneira específica para o patógeno, que pode adaptar a resposta imune ao patógeno. O uso de componentes patogênicos isolados e de hospedeiros mutantes mostrou que respostas transcricionais comuns e específicas são controladas pela ativação de vias de sinalização mediadas por receptores TLR (*Toll-like Receptors*) (Jenner & Young, 2005).

1.3.1 Genes mediadores da inflamação

O grupo de genes que medeiam a inflamação e são mais regulados positivamente consistem praticamente naqueles codificadores de citocinas (denominado grupo de citocinas inflamatórias/quimiotáticas). Este conjunto contém genes que codificam os mediadores pró-inflamatórios TNF, IL1 β , IL6, IL8 e CSF3 (G-CSF), as quimiocinas CCL3 (MIP1 α), CCL4 (MIP1 β), CCL20 (MIP3 α /LARC), CXCL1 (GRO1), CXCL2 (MIP2 α /GRO2) e CXCL3 (MIP2 β /GRO3), e a enzima PTGS2 (ciclooxigenase-2), que está envolvida na produção de

prostaglandinas. Esses genes são induzidos em macrófagos, DCs, leucócitos, PBMCs, sangue total e células epiteliais durante a infecção aguda por numerosas espécies bacterianas (Jenner & Young, 2005).

1.3.2 Genes estimulados por IFN

Este grupo inclui aqueles que codificam PRKR (proteína quinase R), PML (proteína da leucemia promielocítica), OAS1 (2', 5'-oligoadenilato sintetase), OAS2 e OASL, MX1 e MX2, G1P2 (ISG15), IFI16, ISG20 (HEM45) e IFIM1. Além dos genes de quimiocinas *CCL8 (MCP2)*, *CXCL9 (MIG)*, *CXCL10 (IP10)* e *CXCL11 (I-TAC)* e quatro genes de metalotioneína (*MITE*, *MTIG*, *MT1H* e *MT2A*). Esta assinatura de expressão é regulada positivamente em macrófagos e fibroblastos em resposta a IFN (Jenner & Young, 2005).

1.3.3 Genes ativadores da resposta imune

Os fatores de transcrição codificados por este grupo incluem todos os cinco membros da família NF- κ B e seu co-ativador BCL3, os componentes ativadores da proteína-1 (AP1), que são JUN, JUNB e FOSL2. Fatores que medeiam os efeitos do IFN (IRF1, IRF4, IRF7, ISGF3G, STAT1, STAT4, STAT5A e seu co-ativador NMI), ligantes de elemento de resposta cAMP (ATF3, ATF4, BATF e CREM), bem como BCL6, CEBPG, EGR4, HIF1 α , NFATC1, SMAD7 e XBP1. Os componentes de cascatas de transdução de sinal citoplasmáticas que ativam a resposta imune, como MYD88, TRADD, TRAF1 e TRAF6, também estão incluídos neste grupo. Isso indica que a indução da resposta imune é controlada por um ciclo de retroalimentação positiva no qual os ativadores transcripcionais se ativam (Jenner & Young, 2005).

1.3.4 Genes que limitam a resposta imune

Outros genes que estão envolvidos na resposta do hospedeiro são os que realizam *loops de feedback* negativo, pois permitem que a célula retorne ao seu estado não ativado. Estes incluem I κ B- α (codificado por NFKBIA) e I κ B- ϵ (codificado por NFKBIE), que sequestra proteínas NF- κ B no citoplasma. Da mesma forma, os genes que codificam as

quinases MAP2K3, MAP3K4 e MAP3K8, bem como as fosfatases DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5, DUSP6 e DUSP8 (Jenner & Young, 2005).

A indução de fatores de ação positiva e negativa também se estende aos genes que atuam na apoptose. A indução dos genes pró-apoptóticos *BBC3*, *CASP1*, *CASP3*, *CASP4*, *CASP5* e *CASP7*, a citocina TRAIL e a proteína adaptadora TRADD são combatidos pela indução dos fatores anti-apoptóticos BIRC2 e BIRC3, que se ligam a TRAFs, CFLAR (também conhecido como FLIP), que inibe o FLICE e os membros da família BCL2 BCL2A1 e MCL1. Isto indica que as células ativadas por patógenos estão em um estado de "alto alerta" no qual a apoptose pode ser eficazmente iniciada se a infecção progredir ou prevenida se a infecção for resolvida (Jenner & Young, 2005).

1.3.5 Genes adicionais envolvidos na resposta da célula hospedeira

Outros genes que estão relacionados a resposta do hospedeiro são de adesão celular (*ADRM1*, *CD6*, *CD38*, *CD44*, *CD53*, *ICAM1*, *ITGA5*, *ITGAX*, *ITGB8*, *LGALS9*, *LGALS3BP*) e de invasão tecidual (*MMP1*, *MMP7*, *MMP10*, *MMP12*, *MMP14*, *MMP19*) (Jenner & Young, 2005). E além destes, outros genes são induzidos preferencialmente em um tipo celular, como por exemplo em macrófagos (Chaussabel et al., 2003) que apresentam cerca de 80% dos genes envolvidos na ativação e são regulados por pelo menos um estímulo do patógeno (Nau et al., 2002). Alguns dos genes são CSF3R (G-CSF), de adesão celular (*EMILIN*, *CSPG2*, *ITGBL1*, *ITGA6*), os pró-apoptóticos (*TRAF3*, *IL-1 β*) e anti-apoptóticos (*API5* e *TOSO*) (Chaussabel et al., 2003).

1.4 Expressão gênica

Os métodos tradicionais para medir a expressão celular de transcritos individuais foram baseados em sondas de DNA específicas de genes utilizadas para detecção por hibridização (por exemplo Northern blot) ou por amplificação (por exemplo, PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)) e ainda Ensaio de Proteação a Nuclease, Hibridização Subtrativa, Diferencial *Display*, SAGE ou *Microarray* (Moody, 2001).

O desenvolvimento das tecnologias de nova geração (NGS), como o Illumina, 454 e SOLiD™, permitiu o aumento de velocidade do sequenciamento e possibilitou a

decodificação de genomas inteiros (Metzker, 2010). Além disso, foi possível obter os transcritos de uma determinada célula (codificantes ou não-codificantes) em um determinado estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica, técnica chamada de RNA-Seq (Wang et al., 2009).

O RNA-Seq proporciona o refinamento de limites transcritos, a identificação de UTRs, locais de processamento, isoformas de *splice* em eucariotos ou estruturas de operons bacterianos, o rastreamento de TSSs, bem como a identificação de novos genes. Todas essas características imediatamente tornaram o RNA-Seq o método de escolha para estudos transcriptômicos, independentemente do organismo de interesse (Wang et al., 2009).

No entanto, os protocolos de extração de RNA foram desenvolvidos para separar fisicamente o hospedeiro e o patógeno um do outro e enriquecer o RNA bacteriano após a infecção ter ocorrido, mas antes da detecção (Hinton et al., 2004), e isto se deve aos estudos pioneiros de *microarray* que tiveram como objetivo analisar a infecção dentro de modelos de patógeno-hospedeiro conjuntamente, ao invés de um isolamento puro (Rappuoli, 2000). Porém, foi identificada hibridização cruzada e para evitar este problema, chips foram projetados para excluir sondas com alto risco de detectar transcritos de ambos os organismos.

Esta técnica de enriquecimento, ainda utilizada, depende da separação de células ou dos transcritos de células eucarióticas. Primeiramente, se o sistema modelo é baseado em patógenos extracelulares, a interação patógeno-hospedeiro é interrompida e a centrifugação diferencial resulta na sedimentação seletiva das células hospedeiras, enquanto as células bacterianas permanecem na fração sobrenadante. No caso de patógenos intracelulares, as células hospedeiras podem ser seletivamente lisadas (por exemplo, por tratamento com detergente). Assim, a centrifugação diferencial irá sedimentar as células bacterianas intactas, enquanto o lisado do hospedeiro permanece no sobrenadante (Bent et al., 2013).

A segunda forma de discriminar entre o hospedeiro e o patógeno pode ser alcançada a nível de transcrito. Métodos como o kit *MICROBEnrich* fazem uso das diferentes características das espécies de RNA eucarióticas e bacterianas. Os oligonucleotídeos que são específicos para os transcritos eucarióticos mais abundantes (rRNA 18S, rRNA 28S, mRNAs poliadenilados) podem ser acoplados a esferas magnéticas para capturar e extrair uma fração substancial de RNA hospedeiro de uma amostra de transcriptoma misto. Finalmente, a depleção do material do hospedeiro pode ser obtida a nível de cDNA através da captura

seletiva por meio de hibridação utilizando sondas de DNA biotinizadas (Morrow et al., 1999).

Além disso, a crescente sensibilidade do sequenciamento de RNA de alto rendimento permite agora estudos de Dual RNA-Seq, capaz de capturar simultaneamente todas as classes de transcritos codificantes e não-codificantes tanto no patógeno quanto no hospedeiro. Esta técnica permite, uma única etapa, a obtenção do perfil simultâneo de transcriptomas de patógeno-hospedeiro, sem a separação física de células hospedeiras e patogênicas ou de seus transcritos como é realizado em experimentos de *microarray*. Da mesma forma, ocorre um menor número de etapas no fluxo de trabalho experimental, desde a aquisição da amostra até a análise, o que minimiza vieses técnicos. É possível ainda identificar o perfil da expressão do gene do patógeno no nicho de sua célula hospedeira, juntamente com a resposta do hospedeiro sem interromper essa interação estreita que revela o processo de infecção (Westermann et al., 2012).

Para a obtenção dos transcritos de uma infecção, primeiramente, é necessária uma avaliação cuidadosa do desenho experimental e a definição das questões biológicas. Por exemplo, a escolha de tipos e condições do hospedeiro e bactéria; a quantidade de bactérias infectando uma célula hospedeira representada pelo MOI (do inglês *Multiplicity of Infection*); e o tempo do processo de infecção: pois em estágios precoces é provável que haja uma quantidade limitada de RNA bacteriano (Marsh et al., 2017).

Além destes, o número de amostras, condições, quantidade de repetições do experimento, tipo de sequenciador, profundidade do sequenciamento e a seleção de genes diferencialmente expressos do patógeno-hospedeiro que buscam respostas específicas e não específicas da interação são alguns dos fatores importantes para o sucesso da obtenção dos transcritos da infecção (Marsh et al., 2017).

Portanto, a obtenção de transcritos envolvidos em uma infecção por RNA-Seq corrobora para novos *insights* na interação patógeno-hospedeiro, o que permite uma análise mais direcionada em alvos gênicos que auxiliam na defesa do hospedeiro e sobrevivência do patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil de expressão em macrófagos de murino durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão diferencial de genes ativadores da resposta imune dos macrófagos de murino contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliar o perfil de expressão relacionado a resposta imune dos macrófagos de murino contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliar a expressão dos genes mediadores da inflamação dos macrófagos de murino contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- Identificar novos genes ainda não caracterizados, mas possivelmente associados a resposta contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da amostra contendo a *C. pseudotuberculosis*

O patógeno *C. pseudotuberculosis* foi obtido a partir de um linfonodo pré-escapular de ovino infectado contendo material purulento. O material foi coletado em uma fazenda no município de Nova Timboteua/PA. As amostras foram colhidas por veterinários que identificaram os linfonodos com abscessos e posteriormente realizaram uma tricotomia no local e antissepsia com álcool iodado a 5% para retirar o material purulento do linfonodo do animal (Figura 6). O material caseoso foi coletado em seringa de 20 mL e armazenada em gelo e transportada ao Laboratório de Genômica e Biologia de Sistemas da Universidade Federal do Pará para o cultivo e identificação da bactéria a partir do material caseoso.



Figura 6. Retirada do material purulento do linfonodo pré-escapular do animal infectado. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.

3.2 Cultivo e curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis*

Após a coleta de *C. pseudotuberculosis* obtida do material caseoso, a bactéria foi semeada em ágar-sangue contendo 7% de sangue de carneiro e incubada a 37°C por 24-48 horas (Figura 7). As colônias de *C. pseudotuberculosis* foram identificadas através da análise morfológica das colônias, padrão de hemólise e PCR multiplex com os genes *16S*, *rpoB* e *pld* (Pacheco et al., 2007).



Figura 7. Cultura de *C. pseudotuberculosis* em Agar sangue de carneiro. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.

Após a identificação dos isolados de *C. pseudotuberculosis*, a bactéria foi cultivada em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia), caldo, acrescido de Tween® 80 (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,05% sob agitação de 160 rpm à 37°C por 24 horas em uma incubadora tipo *shaker* (Figura 8). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 e plaqueamento em Agar BHI, crescidas por 24-48 horas em estufa à 37°C, para posterior contagem para determinar a curva de crescimento (Dorella et al., 2006).

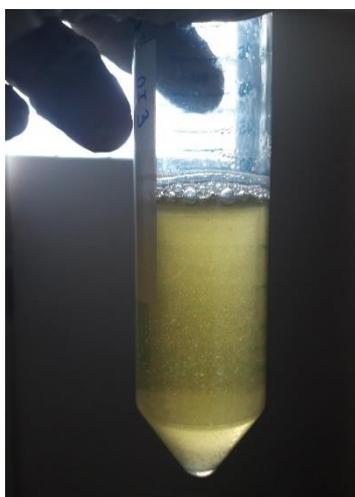


Figura 8. *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio de cultivo BHI caldo acrescido de Tween® 80. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.

Para a determinação da curva de crescimento, o cálculo da quantificação celular foi realizado através da medição da densidade óptica (D.O) em comprimento de onda de 600 nm. A bactéria foi cultivada em placas de BHI-ágar por 48 horas e uma colônia foi retirada e inoculada em 40 mL de meio BHI líquido acrescido de 0,05% de tween 80. A cultura líquida foi colocada em crescimento em incubadora tipo *shaker* à 37°C sob uma rotação de 160 rpm. O crescimento celular foi acompanhado a cada 1 hora, sendo coletado 1 mL da cultura para medição da massa celular em espectrofotômetro. Para calibrar o equipamento (branco), foi utilizado BHI caldo estéril ao longo do experimento nos momentos de avaliação da D.O. de *C. pseudotuberculosis*.

De acordo com as medições das D.O.s, foi realizada a contagem do número de células por mL nas D.O.s correspondentes à fase exponencial de crescimento bacteriano. O plaqueamento em meio ágar BHI nas diluições de 10^{-4} a 10^{-6} foi utilizado para fazer esta contagem através das unidades formadoras de colônias (UFCs) e, para tal, foram utilizados os valores de menores diluições que possibilitaram sua contagem.

O genoma da bactéria deste estudo está depositado no banco de dados do NCBI nomeada como *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa PA09 sob o número de acesso CP054555.1.

3.3 Cultivo da linhagem celular RAW 264.7

A linhagem macrofágica RAW 264.7 utilizada neste trabalho foi obtida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas na Seção de Meio Ambiente (SAMAM), Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, do Instituto Evandro Chagas. As células foram cultivadas em meio de RPMI 1640 (GIBCO – Invitrogen) suplementado com 2g de Bicarbonato de Sódio, 10 mL de HCl 1N, 500 mL de gentamicina, 500mL de estreptomicina, 250 mL de penicilina G sódica e 10% de FBS inativado (*Fetal Bovine Serum*) (Invitrogen), em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 37°C em estufa até subconfluência celular (Figura 9). Foram feitos estoques da cultura em diferentes momentos por criopreservação com 95% FBS + 5% DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) (Fujisawa et al., 2019).

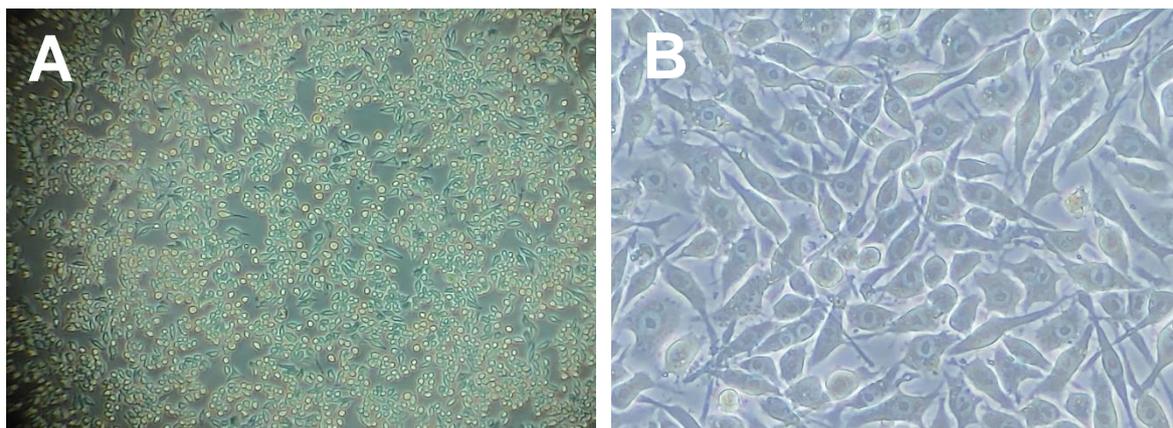


Figura 9. Micrografias de microscópio óptico invertido das células RAW 264.7 após 24 horas de cultivo. (A) Células RAW 264.7 em lente de aumento 5x; (B) Células RAW 264.7 em lente de aumento 32x.

3.4 Infecção dos macrófagos por *C. pseudotuberculosis* PA09

Para o estabelecimento da infecção, inicialmente uma colônia de *C. pseudotuberculosis* PA09 foi cultivada em 20 mL de meio BHI líquido acrescido de Tween a 80%, este inoculo foi incubado sob agitação de 160 rotações por minuto (rpm), à 37°C durante 11 a 12 horas até atingir a fase exponencial (DO = 0.2) em uma incubadora tipo *shaker*. Este inoculo foi utilizado para a infecção na linhagem RAW 264.7.

As células RAW 264.7 viáveis foram quantificadas por meio do teste de exclusão com azul de *Trypan* (0,4% – Sigma Aldrich) e cultivadas previamente em triplicata em garrafas de 50 mL. Em cada garrafa foram semeadas 4×10^6 células por 24 h a 37°C e 5% CO₂ antes da infecção. Posteriormente, estas células foram submetidas à infecção a uma taxa de multiplicidade de infecção 5 (MOI 5), ou seja, 1 macrófago para 5 bactérias. Em seguida, as garrafas foram submetidas a agitação por 30 minutos para sincronizar a infecção (Figura 10) e incubadas em estufa (37°C e 5% CO₂) (Marsh et al., 2017).

Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas e trocado o meio de cultivo para retirar as bactérias que não foram fagocitadas pelos macrófagos e em seguida as células foram novamente colocadas na estufa (37°C e 5% CO₂) por 24 horas. O grupo controle foi realizado em triplicata das células RAW 264.7 sem infecção por *C. pseudotuberculosis*, nas mesmas condições de cultivo e incubação das células com infecção. Após as 24 h, foi realizado a extração do RNA das células RAW 264.7 sem infecção (controle) e das células RAW 264.7 infectadas.



Figura 10. Macrófagos submetidos a agitação para sincronizar a infecção. Fonte: acervo pessoal do autor da tese.

3.5 Extração e avaliação do RNA total das células RAW 264.7

O RNA total das células RAW 264.7 sem infecção (controle) e das células RAW 264.7 infectadas foram extraídas a partir do *PureLink® RNA Mini Kit* (ThermoFisher), sendo seguidas as recomendações do fabricante (Figura 11). O RNA total extraído foi avaliado quanto a concentração no *Qubit® 4.0* (ThermoFisher). E a integridade do RNA foi analisada mediante leitura no equipamento *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB), Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto Evandro Chagas, usando 1 ng de amostra e seguindo as recomendações do fabricante. Um gel virtual é gerado pelo aparelho quando as amostras passam pelos nanocapilares do chip usado. O número de integridade do RNA (RIN) foi obtido mediante a identificação das subunidades ribossomais 18S e 28S nas amostras. Um RIN maior que 8 é o ideal para sequenciamento (Agilent Technologies, 2015).

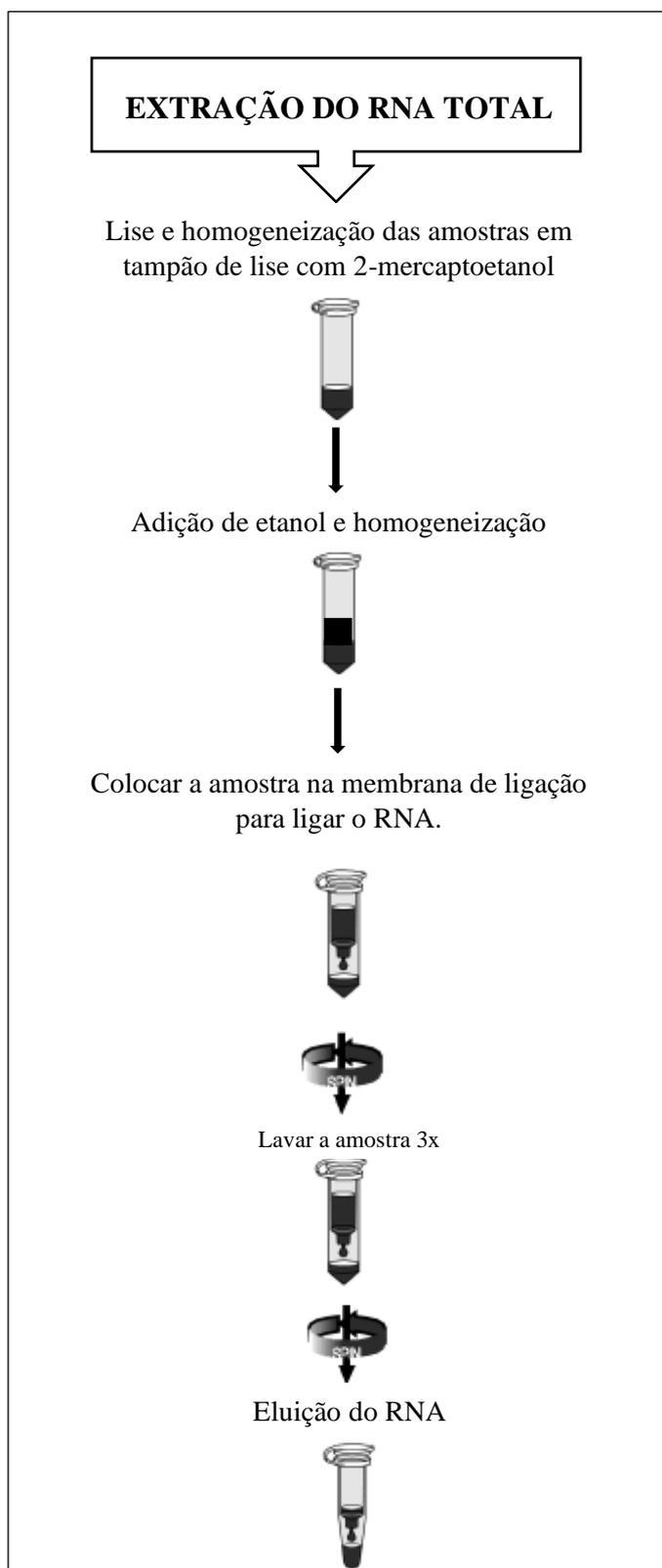


Figura 11. Fluxo de trabalho geral do *PureLink Mini Kit* para a extração do RNA total. Descreva o fluxo de trabalho aqui na legenda.

3.6 Sequenciamento do mRNA das células RAW 264.7

Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o protocolo *SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep System* (Agilent), de acordo com as recomendações do fabricante. Após controle de qualidade, o enriquecimento do mRNA (RNA poli-A) foi realizado nas amostras de RNA total usando *beads* de oligo(dT). O mRNA resultante foi fragmentando, aleatoriamente, usando tampão de fragmentação, então os fragmentos foram utilizados para produção do cDNA, que foi purificado, suas extremidades reparadas, e por último, adaptadores de poli-A adicionados. Finalmente, as amostras foram enriquecidas mediante nova PCR para amplificar e indexar a biblioteca de cDNA ligada ao adaptador (Figura 12). O controle de qualidade foi realizado após preparação das bibliotecas para garantir o tamanho e concentração dos fragmentos, assim como a ligação dos adaptadores. O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina NextSeq® 500, com leituras de 2 x 100 pb de comprimento em modalidade *paired-end*.

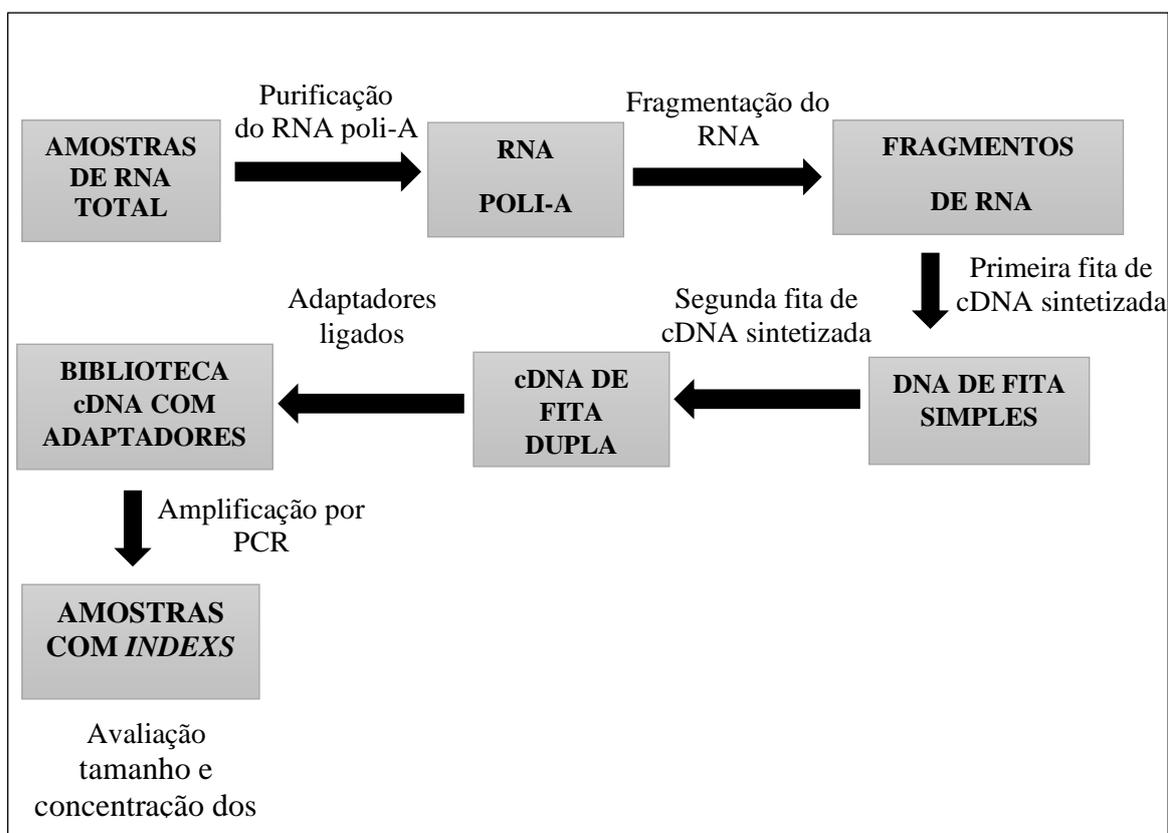


Figura 12. Fluxo de trabalho geral de preparação de amostra de sequenciamento de mRNA.

3.7 Análise dos dados de transcriptoma

A expressão diferencial (DE) dos transcritos das células controle e células infectadas foi analisado através do programa miARma-Seq (Andrés-León et al., 2016). O *pipeline* do miARma-Seq integra análises de: controle de qualidade de dados brutos (FastQC), corte das leituras, com predição de sequência do adaptador se necessário, alinhamento das leituras com a referência do genoma correspondente, análise de expressão diferencial, entre outras. Todas essas etapas podem ser executadas como um *pipeline* inteiro ou como etapas separadas. Para facilitar a execução em etapas únicas, o miARma-Seq foi implementado com uma estrutura de módulo baseada em *Perl*. O *pipeline* do miARma-Seq foi executado de acordo com as instruções do autor, demonstradas (Figura 13) e descritas resumidamente a seguir.

As leituras brutas do sequenciamento foram avaliadas quanto a qualidade das leituras através do Módulo Qualidade, realizada pelo programa FastQC, gerando um relatório de qualidade em html. O arquivo de entrada estava no formato fastq contendo as leituras brutas oriundas do sequenciamento, considerando como qualidade mínima o valor de qualidade da métrica Phred 20 (Ewing et al., 1998) para posteriormente montar o genoma.

Após a avaliação da qualidade, as leituras foram submetidas ao Módulo Alinhador, que utilizou apenas o Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), pois apresenta melhor tolerância a erros de sequenciamento e Indels (Inserção/Deleção) em dados de RNA-Seq (Lindner & Friedel, 2012). As leituras do sequenciamento foram alinhadas com a referência de *Mus musculus* GRCm39, depositada no banco de dados do NCBI sob o número de acesso PRJNA11777. As leituras mapeadas foram submetidas ao Módulo *ReadCount* através do programa featureCounts (Liao et al., 2014), que realizou a contagem do número de leituras que alinharam para cada gene da referência.

Em seguida, foram realizadas as análises de expressão diferencial através do Módulo Expressão Diferencial, que utiliza os programas NOISeq (Tarazona et al., 2015) e edgeR (Robinson et al., 2009), o *pipeline* do programa permiti utilizar estes programas combinados ou isoladamente. Neste estudo foi utilizado o programa edgeR, pois permite não apenas a identificação de elementos DE entre duas condições experimentais, mas comparações mais complexas no mesmo processo de análise.

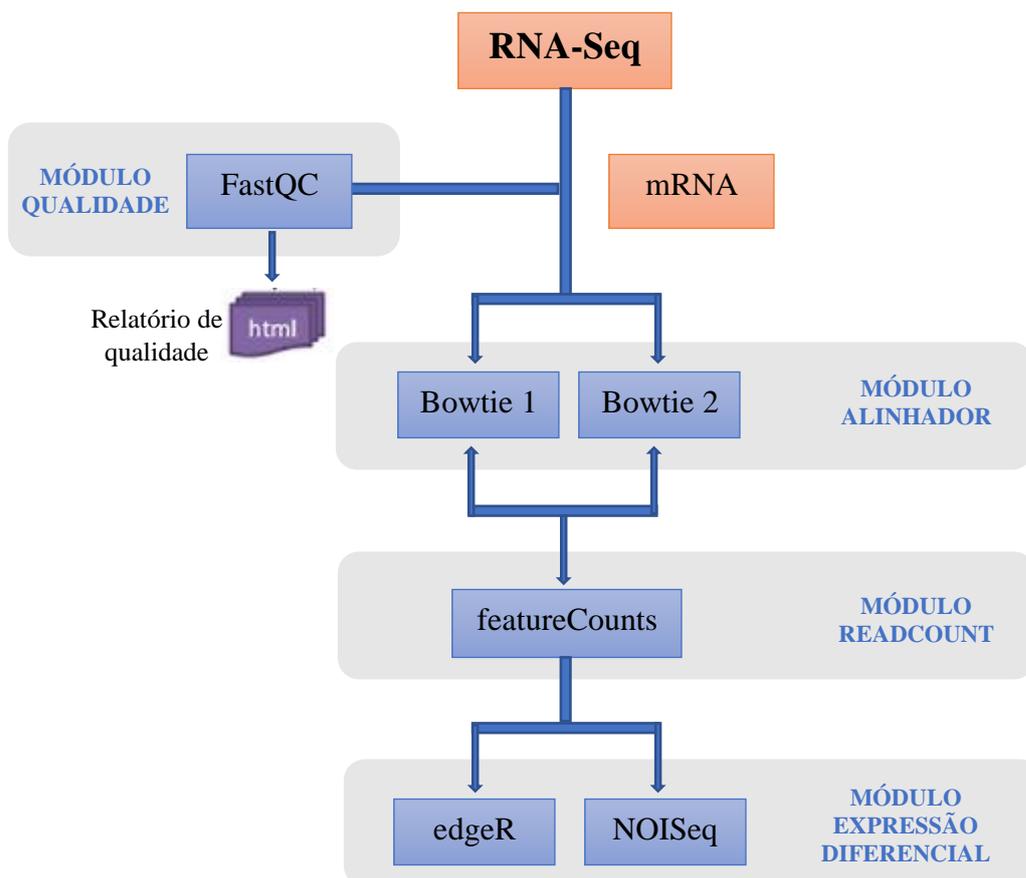


Figura 13. Fluxo de trabalho do pipeline miARma-Seq. Módulos principais são indicados por um fundo cinza. O arquivo de saída é indicado pelo fundo roxo. Adaptado de Andrés-León et al. (2016).

3.7.1 Análise funcional dos transcritos

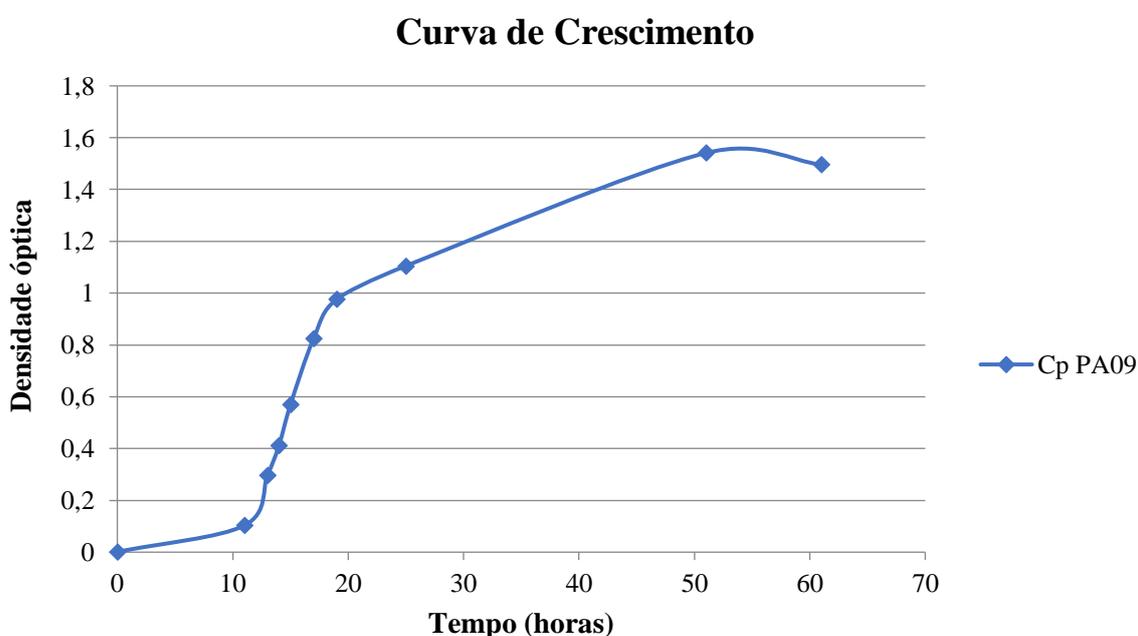
Os transcritos diferencialmente expressos foram submetidos ao programa GO FEAT (Araujo et al., 2018), que realizou a anotação funcional dos transcritos por meio do Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000) a nível de processos biológicos, componente celular e função molecular.

4. RESULTADOS

4.1 Curva de Crescimento de *C. pseudotuberculosis* PA09

C. pseudotuberculosis PA09 iniciou sua fase exponencial em torno de 11-12 horas de curva, apresentando densidade óptica de aproximadamente 0,2 em 600 nm neste período. Esta fase se manteve até às 20 horas de curva onde houve uma redução no ritmo de crescimento bacteriano e por volta de 30 horas de curva a fase estacionária se iniciou. A curva de crescimento começou a entrar em declínio com 51 horas e foi monitorada até a sexagésima primeira hora (Figura 14).

Figura 14. Curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* PA09 medida em densidade óptica de 600 nm (DO_{600nm}) em horas.



Os valores de densidade óptica e o número de células bacterianas por mL de meio de cultivo durante a fase exponencial ($D.O_{600} \cong 0,1 - 0,8$) foram estimados para verificar a quantidade de inóculo necessário para infectar 4×10^6 células da linhagem RAW 264.7 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de D.O e o número de células bacterianas/mL obtidos durante a curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis* PA09.

Tempo de Curva (Horas)	D.O (600 nm)	Células bacterianas/mL
11	0,103	$7,95 \times 10^7$
13	0,296	$1,14 \times 10^8$

14	0,411	$3,3 \times 10^8$
15	0,569	$1,085 \times 10^9$
17	0,824	$2,245 \times 10^9$

4.2 Avaliação da extração do RNA total

As células infectadas e controle apresentaram a integridade do RNA (RIN) acima de 8 (Figura 15) com as bandas ribossômicas 28S e 18S visíveis, indicando alta qualidade para o sequenciamento.

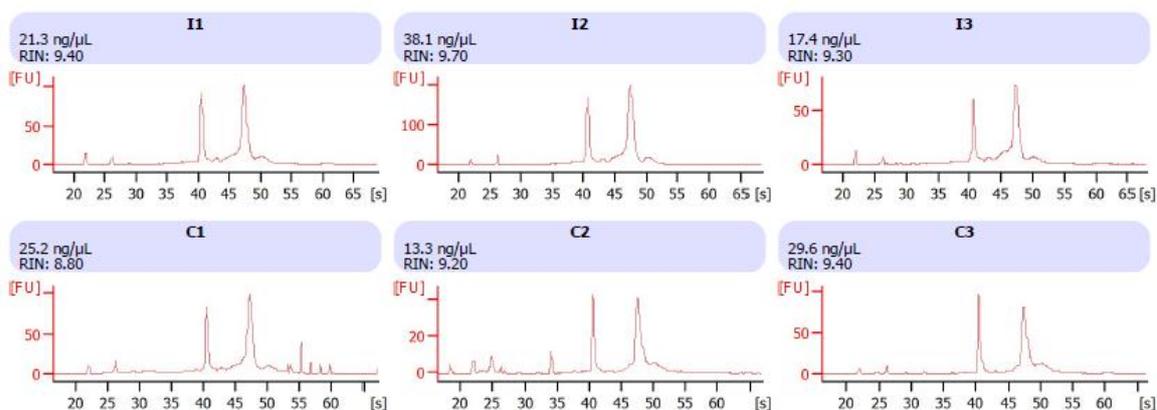


Figura 15. Integridade do RNA total analisado das células infectadas e células controle.

4.3 Avaliação da qualidade dos transcritos

Os transcritos foram avaliados quanto a qualidade das bases das leituras, nas condições em triplicata das células infectadas (I1, I2, I3) e nas condições de células controle (C1, C2, C3) (Apêndice A). Todas as amostras apresentaram qualidade Phred acima ou igual a 20, ou seja, precisão de mais de 99% das bases sequenciadas estão corretas.

4.4 Mapeamento e contagem das leituras

Os transcritos obtidos das células infectadas e controle no sequenciamento foram alinhados contra o genoma de referência de *M. musculus* GRCm39, considerando somente as leituras mapeadas unicamente no genoma (Tabela 2).

Tabela 2. Mapeamento das leituras obtidas no sequenciamento.

Condições	Leituras processadas	Leituras alinhadas	Número de genes identificados
I1	52.821.906	29.166.095 (55.2%)	20.612
I2	36.910.284	20.599.341 (55.8%)	20.793
I3	51.861.143	28.560.685 (55.1%)	20.706
C1	40.385.106	22.975.791 (56.9%)	19.840
C2	57.025.592	32.281.681 (56.6%)	20.673
C3	61.680.451	37.822.081 (61.3%)	21.615

As leituras processadas incluem leituras de todos os transcritos. As leituras alinhadas são os transcritos alinhados contra o genoma de referência de *M. musculus* GRCm39. I – Infectado; C – controle. 1, 2 e 3 – réplicas.

As leituras brutas contadas foram normalizadas pela método TMM (*Trimmed Mean of M values*) que utiliza a média aparada ponderada das relações de expressão logarítmica dos valores M, a qual estima os níveis relativos de produção de RNA entre amostras (Robinson & Oshlack, 2010). Para o cálculo do TMM é obtido a contagem da leitura normalizada do tamanho da biblioteca para cada gene em cada amostra e então é calculado o \log_2 fold change entre duas amostras:

$$M = \log_2 \frac{\text{contagem da amostra tratada}}{\text{contagem da amostra controle}}$$

Após é obtido a contagem de expressão absoluta (valor A):

$$A = \frac{\log_2 (\text{contagem da amostra tratada}) + \log_2 (\text{contagem da amostra controle})}{2}$$

Posteriormente há um corte de duas vezes das porcentagens superior e inferior dos dados, há um corte dos valores M em 30% e dos valores A em 5% (Figura 16 e 17).

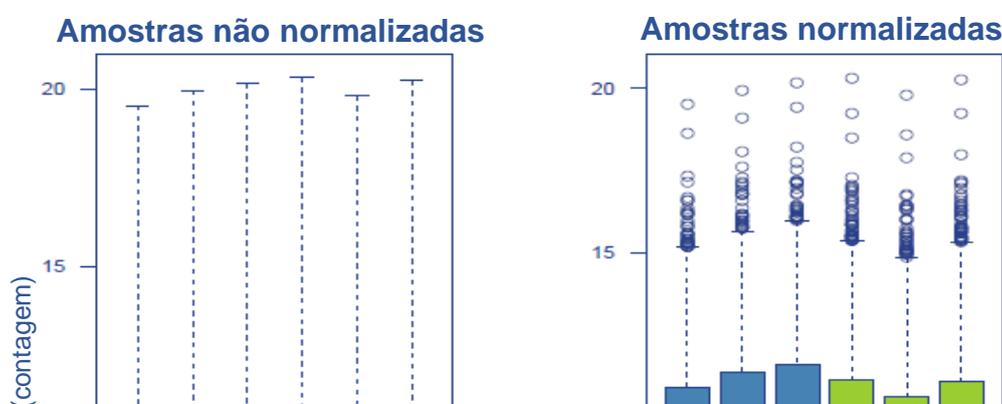


Figura 16. Distribuição das contagens antes e depois do processo de normalização das amostras tratadas e controle.

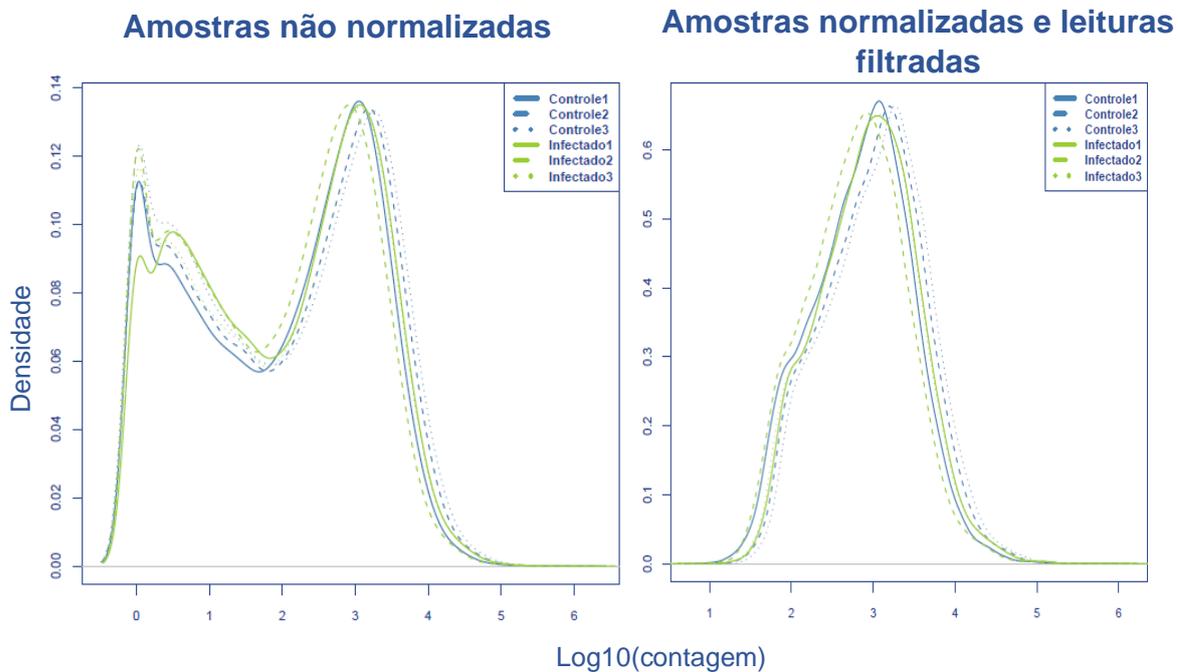


Figura 17. Densidade da distribuição das contagens antes e depois do processo de normalização.

As mostras tratadas (infectadas) e controle foram analisadas por componentes principais (PCA), que divide as amostras em um gráfico bidimensional de acordo com sua

similaridade. De acordo com a análise de PCA as amostras infectadas são semelhantes entre si, assim como as amostras controle (Figura 18).

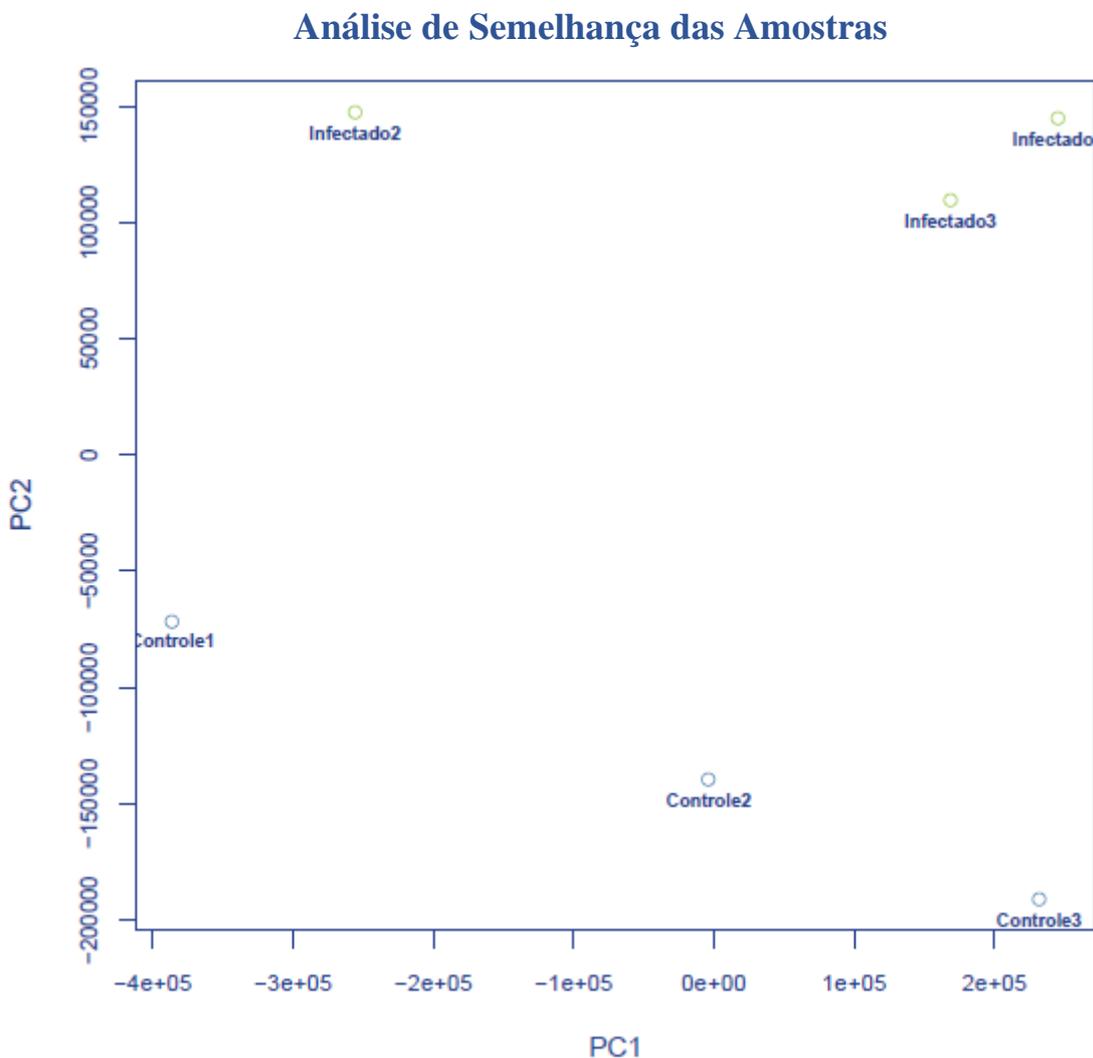


Figura 18. Análise de Componentes Principais. As amostras dividem-se bidimensionalmente de acordo com as suas semelhanças. PC1 – Componente Principal 1; PC2 – Componente Principal 2.

4.5 Genes Diferencialmente Expressos (DE)

O total de genes diferencialmente expressos entre as condições de células infectadas e células controle foram analisados através do valor estatístico *p-value* (≤ 0.05), além de serem analisados quanto ao FDR – Taxa de Falso-Positivo (≤ 0.05). Foram identificados 8.003 genes diferencialmente expressos representados em um gráfico de expressão para cada

comparação (Infectado x Controle). Este gráfico mostra todos os logFCs contra o tamanho médio da contagem, destacando os genes DE (Figura 19). Entre os genes DE foram avaliados os genes que apresentaram a razão de expressão de pelo menos duas vezes (induzido ou reprimido) em relação ao controle. Sendo assim, foram selecionados os genes que apresentaram o valor de $\log_2\text{-fold-change}$ (Log2FC) ≥ 1 (induzido) ou ≤ -1 (reprimido). Foram identificados 529 genes induzidos e 98 reprimidos (Apêndice B).

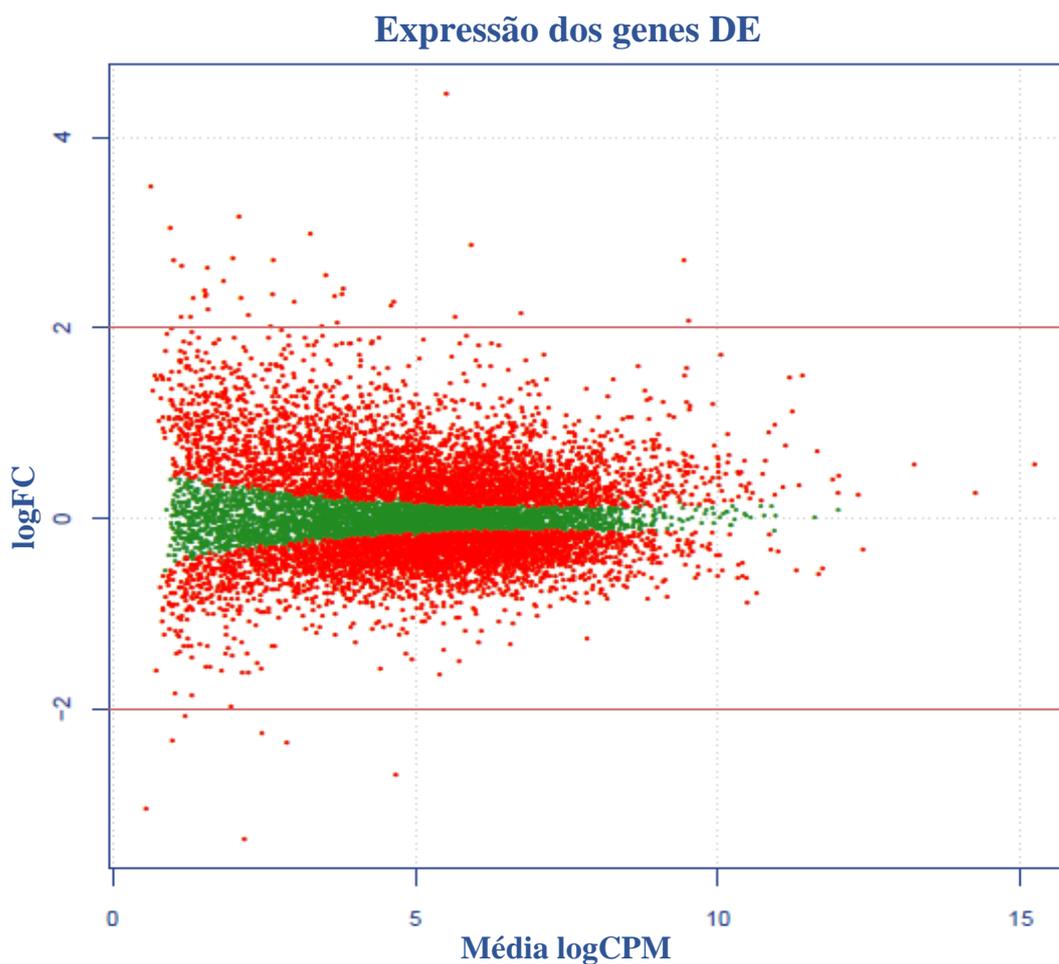


Figura 19. Genes diferencialmente expressos. logFC – razão entre infectado e controle em logaritmo. Média logCPM – média de contagens por milhão. A cor verde representa os genes DE não significativos e a cor vermelha os genes com expressão significativa. A linha vermelha indica o 2-*fold changes*.

As células infectadas e controle foram avaliadas quanto à semelhança entre as amostras de acordo com a expressão de 250 mRNAs mais expressos (Figura 20). As células

infectadas demonstraram semelhança entre a expressão dos genes, assim como as células controle.

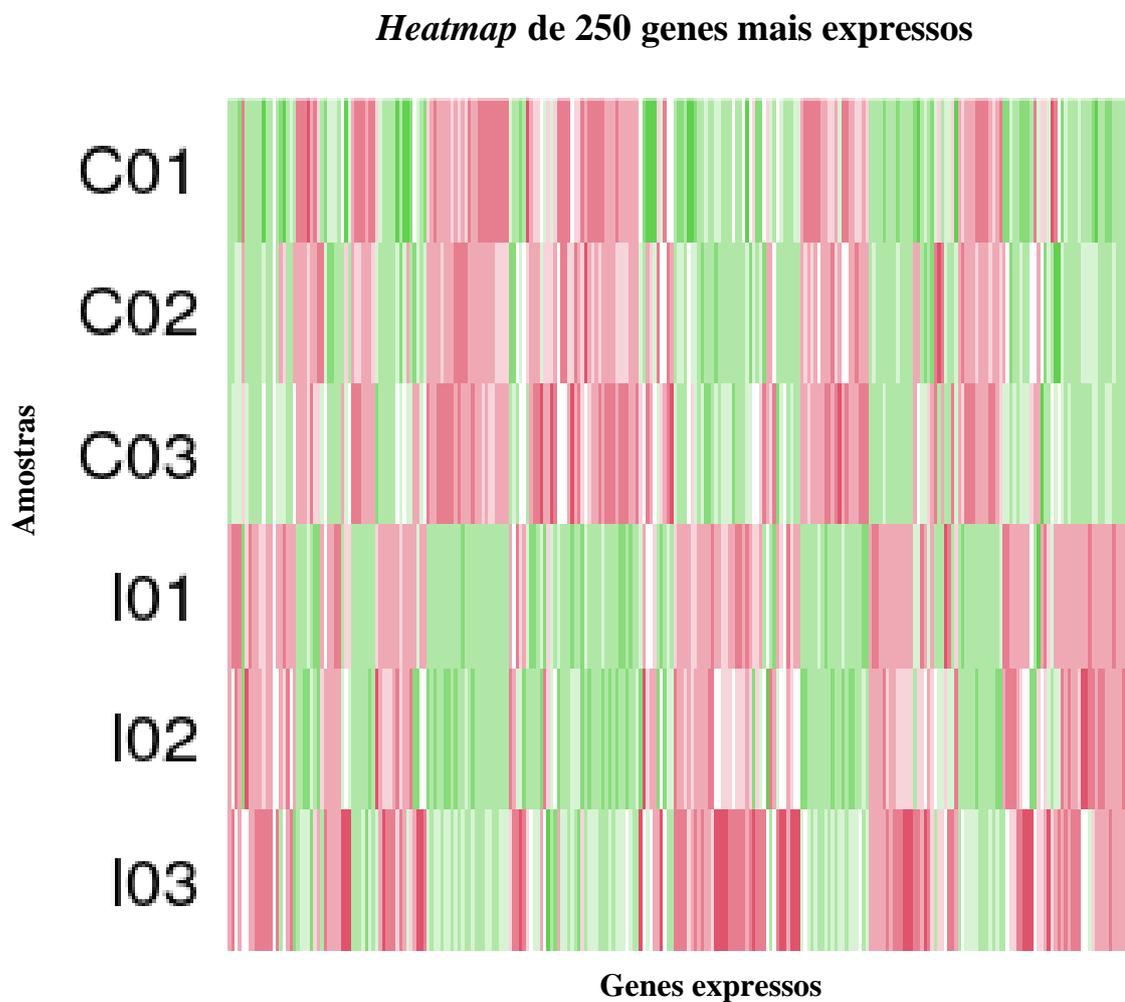


Figura 20. *Heatmap* da semelhança entre as amostras com de acordo com a expressão de 250 mRNAs mais expressos. A cor verde representa genes menos expressos e a vermelha os mais expresso nas amostras infectadas e controle.

4.5.1 Genes induzidos e reprimidos

Os genes induzidos e reprimidos foram analisados quanto ao maior nível de expressão e em relação aos processos biológicos envolvidos na resposta imune do hospedeiro, como ativadores e repressores da imunidade, mediação da inflamação, além de outras respostas que podem auxiliar no combate ao patógeno. Foram identificados 20 genes mais expressos (induzidos e reprimidos) na condição de células infectadas (Tabela 3). Estes genes estão representados na figura 21, que destaca os genes com maior DE.

Tabela 3. Genes mais expressos na condição de células infectadas. (Continua)

Gene_id	Log2FC	p-value	FDR
<i>Csf3</i> (ENSMUSG00000038067)	4,46	0,00	0,00
<i>Cish</i> (ENSMUSG00000032578)	3,48	3,06E-35	1,37E-33
<i>Gbp3</i> (ENSMUSG00000028268)	3,16	6,16E-41	3,94E-39
<i>Mettl26</i> (ENSMUSG00000025731)	3,04	1,05E-30	3,47E-29
<i>Gbp7</i> (ENSMUSG00000040253)	3,00	2,25E-116	2,65E-113
<i>Zmpste24</i> (ENSMUSG00000043207)	2,87	3,28E-317	1,93E-313
<i>Rdh12</i> (ENSMUSG00000021123)	2,74	1,13E-43	8,33E-42
<i>Slfm4</i> (ENSMUSG00000000204)	2,72	2,28E-181	6,69E-178
<i>Csf1</i> (ENSMUSG00000014599)	2,71	1,37E-65	2,60E-63
<i>Cfb</i> (ENSMUSG000000090231)	2,70	7,72E-31	2,60E-29
<i>Gm11541</i> (ENSMUSG00000056008)	-3,37	4,98E-53	5,48E-51
<i>Cst11</i> (ENSMUSG00000055177)	-3,04	3,10E-25	7,05E-24
<i>Klf2</i> (ENSMUSG00000055148)	-2,69	3,63E-87	1,64E-84
<i>Ctsk</i> (ENSMUSG00000028111)	-2,36	7,31E-41	4,65E-39
<i>Serpinb12</i> (ENSMUSG00000059956)	-2,33	9,51E-22	1,62E-20
<i>Rhob</i> (ENSMUSG00000054364)	-2,25	4,62E-37	2,38E-35
Gene_id	Log2FC	p-value	FDR
<i>Enpp6</i> (ENSMUSG00000038173)	-2,08	6,93E-22	1,19E-20

<i>2500004C02Rik</i> (ENSMUSG00000073236)	-1,97	6,09E-19	8,19E-18
<i>H3c4</i> (ENSMUSG00000099583)	-1,86	6,75E-18	8,21E-17
<i>Gm39459</i> (ENSMUSG00000111720)	-1,83	1,17E-15	1,17E-14

Expressão dos genes DE

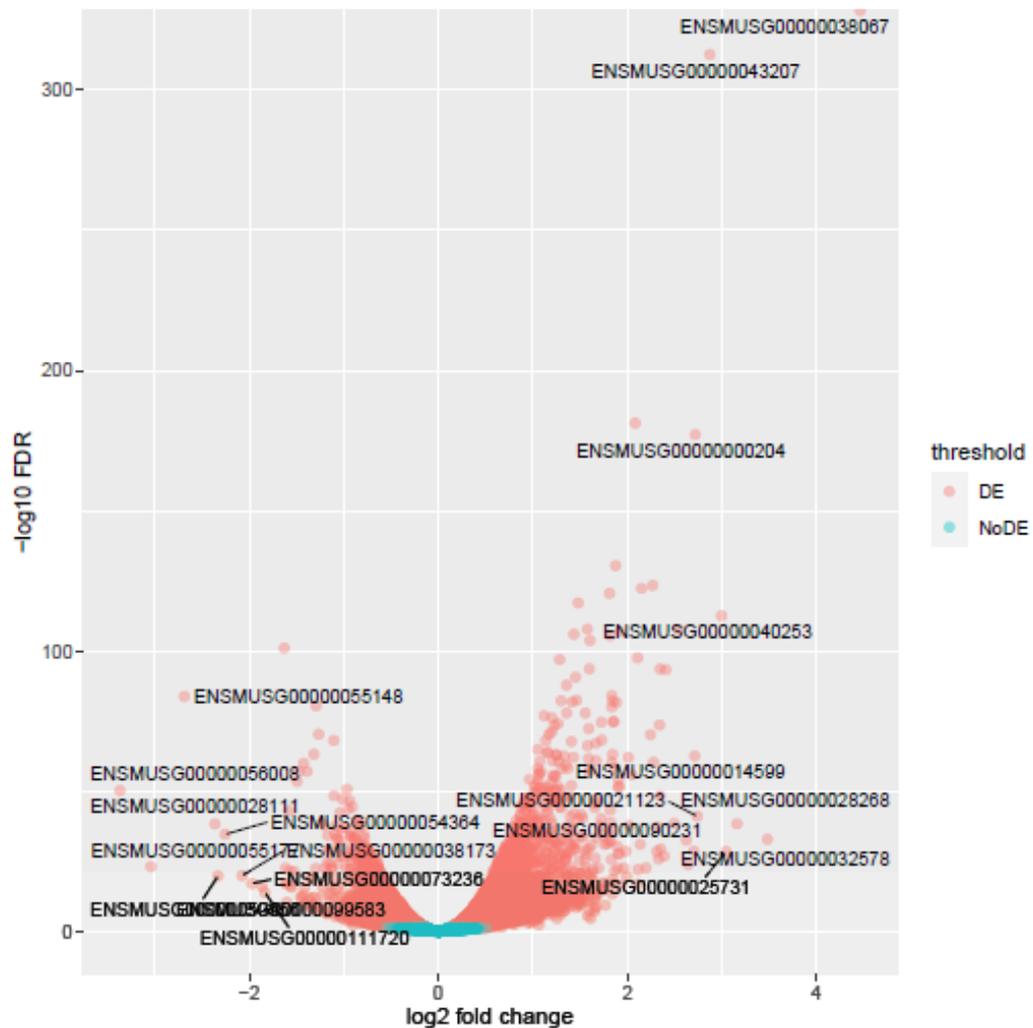


Figura 21. Genes diferencialmente expressos e não diferencialmente expressos. Os genes induzidos e reprimidos com as maiores expressões estão destacados pelo gene_id ENSMUS_. $-\log_{10}FDR$ - Taxa de Falso-Positivo; $\log_2\text{-fold change}$ – razão entre células infectadas e células controle.

Nas análises dos genes induzidos relacionados a resposta imune do hospedeiro frente a infecção do patógeno foram identificados 30 genes induzidos (Tabela 4). Nas análises dos

genes reprimidos não foram identificados genes com expressão diferencial significativa referentes a resposta imune, porém neste estudo o gene *Nfkb1* (Tabela 5), será analisado devido ao seu envolvimento com o estímulo e regulação de citocinas.

Tabela 5. Genes induzidos nas células infectadas, com $\log_2FC \geq 1$. (Continua)

Processo Biológico	Gene	Log2FC	p-value	FDR
Ativação da resposta imune inata	<i>Ifi209</i>	2,01	2,47E-40	1,52E-38
	<i>Ifi204</i>	1,13	3,34E-30	1,07E-28
	<i>Csf3</i>	4,46	0	0
	<i>Tnfrsf1b</i>	1,81	1,90E-124	2,80E-121
Resposta imune	<i>Cxcl2</i>	1,83	2,40E-83	8,54E-81
	<i>Ifi441</i>	2,34	8,30E-77	2,32E-74
	<i>Ccl5</i>	1,35	1,39E-28	3,99E-27
	<i>Il1b</i>	1,96	1,12E-24	2,41E-23
	<i>Rsad2</i>	2,24	2,78E-73	6,81E-71
	<i>Oas3</i>	1,05	5,64E-61	8,62E-59
	<i>Herc6</i>	1,51	2,49E-44	1,89E-42
Resposta imune inata	<i>Ifit1</i>	1,39	1,77E-33	7,12E-32
	<i>Wrnip1</i>	1,28	5,63E-30	1,78E-28
	<i>Il27</i>	1,26	3,89E-14	3,31E-13
	<i>Trim34b</i>	1,20	1,86E-08	7,83E-08
	<i>Rsad2</i>	2,24	2,78E-73	6,81E-71
Regulação positiva da resposta imune	<i>Rsad2</i>	2,24	2,78E-73	6,81E-71
Regulação negativa da resposta imune	<i>Pdcd1</i>	1,27	3,06E-23	5,87E-22
Regulação positiva da produção de citocinas envolvidas na resposta imune	<i>Scimp</i>	1,40	6,58E-55	8,07E-53
	<i>Tnfrsf1b</i>	1,81	1,90E-124	2,80E-121
Resposta inflamatória	<i>Ptgs2</i>	2,08	1,44E-185	5,64E-182
	<i>Epha2</i>	1,90	3,96E-54	4,56E-52
	<i>Sdc1</i>	1,25	2,12E-25	4,86E-24

	<i>Il1b</i>	1,96	1,12E-24	2,41E-23
	<i>Il27</i>	1,26	3,89E-14	3,31E-13
	<i>Wdr83</i>	1,38	3,38E-21	5,44E-20
Regulação negativa da resposta inflamatória	<i>Pbk</i>	1,03	1,70E-11	1,06E-10
Regulação positiva da resposta inflamatória	<i>Lpl</i>	1,47	5,71E-121	7,46E-118
	<i>Il1b</i>	1,96	1,12E-24	2,41E-23

Processo biológico – domínio biológico relacionado aos processos mais amplos dentro de uma célula. Log2FC – valor da expressão relativa entre células infectadas e controle através do logaritmo na base 2.

Tabela 7. Gene expresso nas células infectadas envolvido no estímulo e regulação de citocinas.

Processo Biológico	Gene	Log2FC	p-value	FDR
Resposta celular ao estímulo de citocinas	<i>Nfkb1</i>	-0,10	0,08*	0,12*
Regulação negativa da produção de citocinas				

Processo biológico – domínio biológico relacionado aos processos mais amplos dentro de uma célula. Log2FC – valor da expressão relativa entre células infectadas e controle através do logaritmo na base 2. *gene que apresentou valor de p-value e FDR > 0,05 não apresentou repressão significativa.

4.5.2 Análise dos Processos Biológicos dos genes induzidos e reprimidos

Os genes induzidos e reprimidos foram analisados quanto aos processos biológicos que identificam processos maiores realizados por várias atividades moleculares. Foi gerado uma nuvem de palavras para demonstrar a representatividade de cada processo que os genes induzidos (Figura 21) e reprimidos (Figura 22) estão envolvidos. A nuvem de palavras identificou que alguns genes estão relacionados a resposta imune do hospedeiro, bem como processos que auxiliam na resposta contra o patógeno. E nos genes reprimidos foi

identificado um gene, sem expressão significativa, que está envolvido em atividades de resposta celular a estímulos de citocinas.

Processos Biológicos dos Genes Induzidos

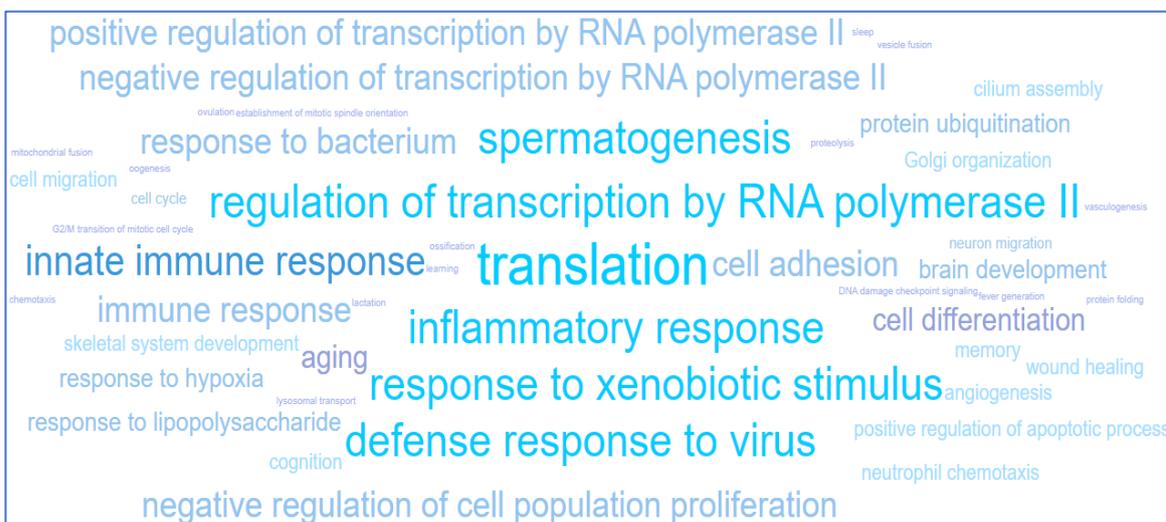


Figura 22. Nuvem de palavras que representam os processos biológicos que os genes induzidos estão envolvidos.

Processos Biológicos dos Genes Reprimidos

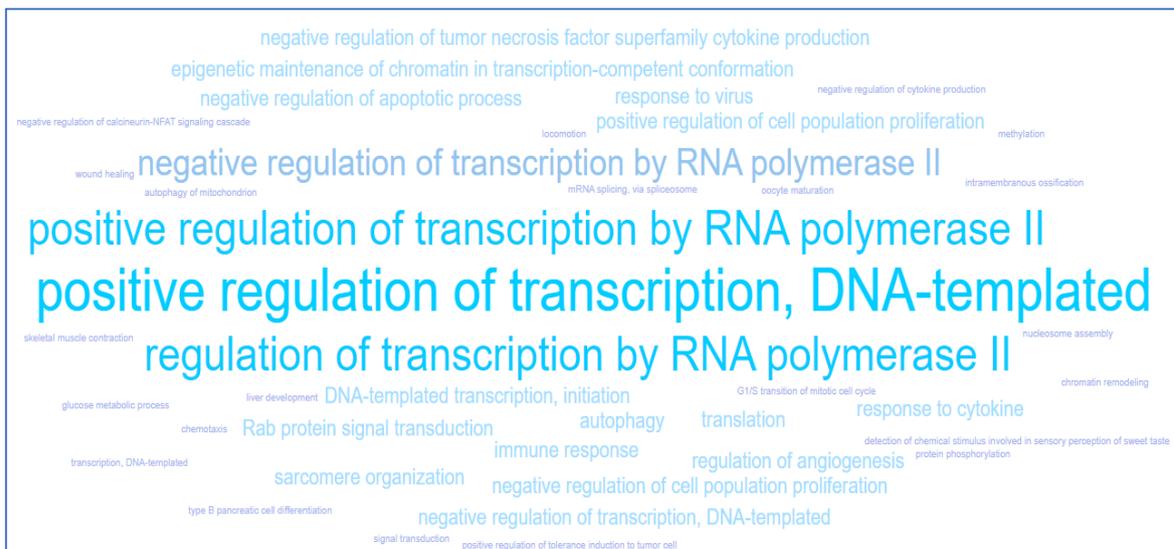


Figura 23. Nuvem de palavras que representam os processos biológicos que os genes reprimidos estão envolvidos.

5. DISCUSSÃO

O conhecimento dos principais mecanismos de defesa imune contra os diversos agentes infecciosos permite a compreensão da patogênese das doenças infecciosas e das várias estratégias do hospedeiro e do patógeno. O sistema imunológico atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. O perfil da expressão gênica dos transcritos que estão envolvidos no processo de reposta imune e de genes que auxiliem neste processo, foram analisados neste estudo buscando o entendimento da resposta do hospedeiro frente a infecção por *C. pseudotuberculosis*. Entre os genes induzidos e reprimidos foram identificados genes que estão relacionados com resposta do hospedeiro frente a uma infecção, demonstrando o possível perfil pelo qual a doença LC pode se estabelecer em células macrofágicas.

5.1 Genes induzidos com maiores níveis de expressão diferencial envolvidos com resposta imune do hospedeiro.

Os genes *Csf3*, *Csf1*, *Cish*, *Gbp7* e *Slfn4* estão envolvidos em processos biológicos e funções moleculares referentes a atividades de citocina, como regulação negativa e a resposta de defesa contra bactérias, segundo as ontologias disponibilizadas pelo Consórcio UniProt (<https://www.uniprot.org/>). O gene *Csf3* apresentou a expressão de 4 vezes (*fold-change* 8) mais induzido na condição de células infectadas em relação ao controle (Tabela 3). Este gene é codificante de um Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) que é uma das principais citocinas hematopoiéticas, descrita como uma molécula monomérica em solução que possui uma sequência de 174 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 18,8 kDa. Seu papel biológico inclui respostas imunes, proliferação e sobrevivência celular, desempenhando um importante papel na defesa do hospedeiro, já que regulam parte da atividade das células que participam da imunidade inata e específica (Martins et al., 2010).

O gene *Csf1* (fator estimulador de colônias de macrófagos – M-CSF) também apresentou como função molecular atividade de citocina. CSF-1 é o mais pleiotrópico fator de crescimento de macrófagos, estimulando a sobrevivência, proliferação e diferenciação de fagócitos mononucleares, além da propagação e motilidade de macrófagos (Pixley & Stanley, 2004). CSF-1 está associado à polarização de macrófagos M2 (Hamilton, 2008).

Macrófagos M2 diminuíram a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuíram a morte microbiana e a atividade de fagocitose. Assim, eles produzem mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β , para promover o amortecimento das respostas imunes (Katakura et al., 2004).

Em contrapartida, o gene *Cish* codifica uma proteína da família SOCS que faz parte de um sistema de feedback negativo clássico, que regula a tradução do sinal de citocinas. *Cish* está envolvido na regulação negativa de citocinas que sinalizam através da via JAK-STAT5 (via envolvida em processos como imunidade, divisão e morte celular), como o receptor de interleucina 2 (IL2) (Burnham et al., 2013). *Cish* demonstrou ser o gene mais consistentemente supra-regulado pela estimulação de IL2 em humanos (Jin et al., 2006) e parece ser crítico para a proliferação e sobrevivência de células T (Kovanen & Leonard, 2004) em resposta à infecção. Uma característica principal da resposta imune do hospedeiro à infecção por patógenos estruturalmente diversos é a resposta de citocinas inflamatórias (Flynn & Chan, 2003). A citocina pró-inflamatória central interleucina-2 (IL2) determina a magnitude e a duração da resposta das células T imediatamente após o encontro com o antígeno (Aman et al., 1999) e auxilia na maturação de macrófagos e na proliferação de células B e células natural killer (Lin & Leonard, 1997) nos estágios iniciais da resposta imune adaptativa.

As citocinas são moléculas de sinalização potentes, tão importantes para a vida quanto os hormônios e neurotransmissores. São proteínas de baixo peso molecular que medeiam a comunicação intercelular e são produzidas por muitos tipos de células, principalmente as do sistema imunológico. Essas moléculas comandam uma variedade de processos que vão desde a regulação da inflamação local e sistêmica até a proliferação celular, metabolismo, quimiotaxia e reparo de tecidos (Duque & Descoteaux, 2014).

A função primária das citocinas é regular a inflamação e, como tal, desempenham um papel vital na regulação da resposta imunológica na saúde e na doença. As citocinas são essenciais para as funções dos macrófagos. Eles medeiam o desencadeamento de uma resposta imune eficaz, ligam a imunidade inata e adaptativa e influenciam o microambiente do macrófago (Huynh et al., 2007; Unanue et al., 1976). Portanto, os genes que codificam citocinas neste estudo demonstram ter uma importância fundamental na ação dos macrófagos de murino a combater a infecção por *C. pseudotuberculosis*, devido aos seus níveis de expressão elevados.

Os genes *Gbp7* e *Slfn4* que apresentaram expressão de 3 e 2 vezes, respectivamente, em relação ao controle são codificantes que apresentam em seus processos biológicos a resposta de defesa às bactérias Gram-positivas (Uniprot). O gene *Gbp7* apresenta função molecular de GTPase. Este tipo de proteína pode exercer atividade no processo de reconhecimento na captação e destruição do patógeno, pois após internalização do microrganismo, o fagossomo nascente inicialmente formado adquire as propriedades microbicidas e degradativas necessárias para a eliminação do patógeno durante um processo denominado maturação do fagossomo (Flannagan et al., 2012). Por este meio, a sequência de fusão com compartimentos da via endocítica, bem como a reciclagem de componentes do fagossomo é essencial e altamente regulada por GTPases do tipo Rab (Gutierrez, 2013).

Em todas as proteínas do gene *Slfn* há um único domínio N-terminal divergente AAA (ATP-ases associadas a várias atividades celulares), o qual se presume estar envolvido na ligação GTP / ATP (Geserick et al., 2004). Estudos realizados com os membros da família do gene *Slfn*, demonstraram que a expressão deste é modulada durante infecções bacterianas, o que sugere um papel para esta família de genes na defesa do hospedeiro. Zuylen e colaboradores (2011) identificaram que a expressão de *Slfn4* foi regulado de forma significativa durante a ativação e diferenciação de macrófagos.

5.2 Genes reprimidos com maiores níveis de expressão diferencial envolvidos com resposta imune do hospedeiro.

A catepsina K é um membro da família cisteína protease das proteases lisossomais da catepsina. Como uma protease, a catepsina K é a principal enzima responsável pela degradação do colágeno tipo I e do tipo II, além de degradar com eficiência outros componentes da matriz extracelular orgânica (Drake et al., 2017). Nos resultados deste estudo o gene *Ctsk* que codifica a proteína catepsina K foi reprimida 2 vezes (Tabela 3).

Os macrófagos, além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de microrganismos pela fagocitose, após lhes fagocitar e processá-los nos fagossomas, apresenta seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares (Wynn & Vannella, 2016). Desta forma, a fagocitose destas células atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo. Além disso, é a célula mais eficiente na eliminação de fragmentos teciduais

inclusive removendo pela fagocitose os neutrófilos que perderam função (Silva, 2011). Devido ao macrófago conter os patógenos nos fagossomos, a expressão reprimida da Catepsina K não seria vantajosa a ação da protease no momento da infecção.

5.3 Genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro

Os processos biológicos identificados nos genes induzidos e reprimidos estão relacionados com a resposta imune do hospedeiro frente a uma infecção. Deste modo, é possível avaliar as rotas utilizadas pelos macrófagos para se proteger da infecção.

5.2.1 Genes induzidos

Os *Ifi209* e *Ifi204* estão envolvidos na ativação da resposta imune inata (Tabela 4) e são estimulados por interferon (Dauffy et al., 2006). O sistema imunológico inato desempenha um papel fundamental no reconhecimento e eliminação precoce de patógenos invasores. Muitos sistemas de reconhecimento do hospedeiro conseguem identificar os PAMPs, como ácidos nucleicos e componentes da parede celular do patógeno (Vance et al., 2009). Após o reconhecimento do PAMP, as células imunes iniciam as cascatas de transdução de sinal que desencadeiam uma resposta transcricional de IFN tipo I, que pode induzir uma ampla gama de respostas adicionais à infecção, incluindo morte celular mediada pela caspase-1 e liberação de citocina pró-inflamatória (Stetson & Medzhitov, 2006). IF204 também está envolvido na detecção de infecção intracelular (Chen et al., 2019). A destruição de IFI204 / IFI16 por pequenos RNA interferentes (siRNAs) inibiu significativamente a liberação de IFN- β em resposta a infecções bacterianas intracelulares, como *Listeria monocytogenes* (Hansen et al., 2014), *Mycobacterium bovis* (Chunfa et al., 2017).

O processo biológico de resposta imune inata (*Rsad2*, *Oas3*, *Herc6*, *Ifit1*, *Wrnip1*, *Il27* e *Trim34b*) e resposta imune (*Csf3*, *Tnfrsf1b*, *Cxcl2*, *Ifi44l*, *Ccl5* e *Il1b*) (Tabela 4) apresentam genes envolvidos na resposta contra infecção. Na resposta imune inata 3 genes apresentaram proteínas não caracterizadas (*Rsad2*, *Herc6* e *Ifit1*), sendo necessária a caracterização proteica em estudos posteriores, devido o seu envolvimento no processo de

reposta imune de macrófagos de murino contra *C. pseudotuberculosis*, por ter se mostrado induzido nas análises de RNA-Seq.

Na resposta imune o gene *Csf3* está entre os genes que mais apresentaram o maior nível de expressão diferencial, já discutido na seção 5.1. O gene *Tnfrsf1b* codifica um receptor de TNF que é uma citocina multifuncional que pode afetar múltiplas respostas celulares, como inflamação (Aggarwal et al., 2012). Estas funções são mediadas através da ligação do TNF aos receptores TNFR1 (gene TNFRSF1A) ou TNFR2 (gene TNFRSF1B) (Li & Anderson, 2018). O gene *Ifi44l* codifica uma proteína induzida por interferon.

E os genes *Cxcl2* e *Ccl5* são quimiocinas, citocinas quimiotáticas, que atuam no recrutamento de células T, macrófagos e neutrófilos para os locais de inflamação. O sistema imunológico, que depende da migração coordenada de células, é particularmente dependente de quimiocinas para sua função. As quimiocinas não apenas guiam as células imunológicas efetoras para os locais de infecção ou inflamação, mas também coordenam as interações entre as células imunológicas. Ao fazer isso, as quimiocinas promovem as interações entre os sistemas imune inato e adaptativo, moldando e fornecendo o contexto necessário para o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas ótimas (Sokol & Luster, 2015).

Nos processos biológicos de regulação positiva e negativa da resposta imune foram induzidos os genes *Rsad2* (regulação positiva) que ainda não é uma proteína caracterizada e o gene *Pdcd1* (regulação negativa), além do gene *Scimp* que participa no processo de regulação positiva da produção de citocinas envolvidas na resposta imune. O gene *Pdcd1* codifica uma molécula de morte celular programada 1 (PD-1) e pertence à família de receptores CD28 e é expressa por células T, B ativadas e mieloides (Braun-Prado & Petzl-Erler, 2007). PD-1 desempenha um papel importante na indução e / ou manutenção da tolerância periférica. Após a interação com seus ligantes (PD-L1 e PD-L2), PD-1 inibe a estimulação do antígeno de células T e B (Sharpe e Freeman, 2002).

O gene *Scimp* (adaptador SLP e proteína de membrana que interage com CSK, que foi relatada como associada às quinases da família Src (SFKs) e para regular a sinalização de MHC de classe II em Células B (Draber et al., 2011). Em macrófagos, o SCIMP está constitutivamente associado à tirosina quinase Lyn e é necessário para a fosforilação da tirosina de TLR4 e facilita a produção induzível por TLR das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12p40. Mutações pontuais em SCIMP que anulam a ligação de TLR4 também evitam

a produção de citocinas mediada por SCIMP, que é, portanto, um adaptador TLR específico do sistema imunológico que molda a defesa e a inflamação do hospedeiro (Luo et al., 2017).

Os genes induzido relacionados a processos de reposta inflamatória e a regulação positiva e negativa (Tabela 4) apresentaram os genes *Tnfrsf1b*, *Ptgs2*, *Epha2*, *Sdc1*, *Il1b*, *Il27*, *Wdr83* (reposta inflamatória), *Pbk* (regulação negativa da resposta inflamatória) codifica uma quinase, *Lpl* (codifica uma lipase), e *Il1b* (regulação positiva da resposta inflamatória). O gene *Epha2* codifica receptores de hepatoma produtor de eritropoietina (Eph) são uma família de receptores tirosina quinases presentes em muitos eucariotos (Nakamoto, 2000). Em *M. tuberculosis* induz *epHA1* e *epHA3* em células monocíticas (Mcgarvey et al., 2004).

Estudos com camundongos demonstrou a indução de EPHA1, sendo que estes animais apresentaram maior patologia, maior acúmulo de células T e níveis mais elevados de citocinas pro-inflamatórias do que em camundongos sem infecção, além disso, a ausência de EPHA2 resultou em maior eliminação de *M. tuberculosis* durante a fase crônica da infecção, sugerindo que a indução de EPHA2 é importante para a sobrevivência de *M. tuberculosis* durante a latência (Khounlotham et al., 2009). Neste estudo o gene *Epha2*, também demonstrou indução de 1 vez, inferindo que este gene esteja envolvido na sobrevivência de *C. pseudotuberculosis* em macrófagos de murino.

5.2.2 Genes reprimidos

O gene *Nfkb1* é um fator nuclear de NF-kappa-B. NF-kappa-B é um fator de transcrição pleiotrópico presente em quase todos os tipos de células e é o ponto final de uma série de eventos de tradução de sinal que são iniciados por uma vasta gama de estímulos relacionados a muitos processos biológicos, como inflamação, imunidade, diferenciação, e crescimento celular. Diferentes combinações de dímeros atuam como ativadores ou repressores transcricionais, respectivamente (Minami et al., 2008). O *Nfkb1* não apresentou expressão significativa, porém mesmo em baixos níveis de expressão, pode estar envolvido nos processos de resposta celular ao estímulo de citocinas e regulação negativa da produção de citocinas.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho proporcionou uma visão, a nível molecular, mais detalhada da complexa rede que a célula hospedeira utiliza para enfrentar o estabelecimento da Linfadenite Caseosa. Os elementos que compõe a imunidade do hospedeiro apresentaram principalmente expressão induzida durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*. O tempo de infecção pode influenciar diretamente na expressão de genes ligados a resposta imune tardia. Devido a isto, é necessário avaliar mais tempos de infecção para avaliar mais amplamente a rede de resposta imune.

Durante as três horas de infecção, estabelecido neste estudo devido a observação da fagocitose das bactérias, foram expressos genes essenciais para a ativação, regulação positiva e negativa de transcritos que auxiliam no processo de combate a proliferação do patógeno e estabelecimento da doença.

Os genes com expressão induzida apresentaram principalmente função de citocinas, nas quais são importantes proteínas que se auto modulam e modulam outras células responsáveis pelo enfrentamento a patógenos. Importante notar que dentre os genes induzidos, *Epha2* pode estar envolvido na sobrevivência de *C. pseudotuberculosis*, ou seja, apenas fatores de virulência e patogenicidade do microrganismo não são importantes para a sobrevivência do patógeno, mas os mecanismos do hospedeiro podem auxiliar no processo de estabelecimento da doença. Por isso, é importante a avaliação da interação do patógeno e hospedeiro após o estabelecimento da infecção.

Os processos biológicos identificados pela função dos genes exibiram grande representatividade em processos de resposta imune, confirmando que a célula hospedeira, mesmo com as bactérias resistindo aos fagolisossomos, busca estratégias de eliminação do patógeno.

O estudo com a linhagem celular de macrófagos de murino viabilizou as análises de infecção, pois como se apresenta como uma linhagem celular de macrófagos maduros, não foi necessário utilizar outros fatores que induzisse a sua diferenciação e assim adicionando uma outra variável a infecção *in vitro*.

Portanto, as análises *in vitro* da infecção da linhagem de macrófagos de RAW 264.7 por *C. pseudotuberculosis* mimetizou com significância a infecção ocorrida em hospedeiros naturais, o que viabiliza posteriores estudos de genes específicos que auxiliem nos estudos de vacinas para esta doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, D., & Sisay Tessema, T. (2015). Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology*, *61*(5), 469–476. <https://doi.org/10.1111/lam.12482>
- Addo, P. B. (1979). Pathology and bacteriology of abortion in sheep experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa. Bulletin Des Sante et Production Animales En Afrique*, *27*(4), 257–262. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/548139>
- Aftabuzzaman, M.; Cho, Y. (2021). Recent perspectives on caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats-A review. *Korean Journal of Veterinary Service*, *44*(2), 61–71. <http://kjves.org>
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, *119*(3), 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Al-Gaabary, M. H., Osman, S. A., & Oreiby, A. F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research*, *87*(1–3), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.008>
- Al-Harbi, K. B. (2011). Prevalence and etiology of abscess disease of sheep and goats at Qassim Region, Saudi Arabia. *Veterinary World*, *4*(11), 495–499. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2011.495-499>
- Alloui, M. N., Kaba, J., & Alloui, N. (2011). Prevalence and risk factors of caseous lymphadenitis in sheep and goats of Batna area (Algeria). *RESEARCH OPINIONS IN ANIMAL & VETERINARY SCIENCES*, 162–164. www.roavs.com
- Almeida, S., Dorneles, E. M. S., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., Carneiro, A., Bagano, P., Spier, S., Barh, D., Lage, A. P., Figueiredo, H., & Azevedo, V. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Veterinary Research*, *13*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1210-5>
- Alonso, J. L., Simon, M. C., Girones, O., Muzquiz, J. L., Ortega, C., & Garcia, J. (1992). The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. *Research in Veterinary Science*, *52*(3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90023-u](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90023-u)
- Alves, F. S. F., Santiago, L. B., & Pinheiro, R. R. (2007). Linfadenite Caseosa: O Estado da Arte. *EMBRAPA. Documentos*, *74.*, 1ª edição, 57. ISSN 1676-7659.
- Aman, M. J., Migone, T. S., Sasaki, A., Ascherman, D. P., Zhu, M. H., Soldaini, E., Imada, K., Miyajima, A., Yoshimura, A., & Leonard, W. J. (1999). CIS associates with the interleukin-2 receptor β chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(42), 30266–30272. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30266>
- Andrés-León, E., Núñez-Torres, R., & Rojas, A. M. (2016). miARma-Seq: A comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Scientific Reports*, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep25749>
- Araujo, F. A., Barh, D., Silva, A., Guimarães, L., & Ramos, R. T. J. (2018). GO FEAT: A rapid web-based functional annotation tool for genomic and transcriptomic data.

- Scientific Reports*, 8(1), 8–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20211-9>
- Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J. R., Boisclair, J., Simard, C., & Bélanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(1–2), 67–81. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00060-6)
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Augustine, J., & Renshaw, H. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. *American Journal of Veterinary Research*, 47(4), 713–715.
- Ayers, J. L. (1977). Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171(12), 1251–1254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/342466>
- Baird, G. J., & Fontaine, M. C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. 137. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.07.002>
- Batey, R. G. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, 63(9), 269–272.
- Bent, Z. W., Tran-Gyamfi, M. B., Langevin, S. A., Brazel, D. M., Hamblin, R. Y., Branda, S. S., Patel, K. D., Lane, T. W., & Vandernoot, V. A. (2013). Enriching pathogen transcripts from infected samples: A capture-based approach to enhanced host-pathogen RNA sequencing. *Analytical Biochemistry*, 438(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.03.008>
- Binns, S. H., Bailey, M., & Green, L. E. (2002). Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Veterinary Record*, 150(9), 263–268. <https://doi.org/10.1136/vr.150.9.263>
- Bjorkroth, J., Korkeala, H., & Funke, G. (1999). rRNA gene RFLP as an identification tool for *Corynebacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3), 983–989. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-983>
- Braun-Prado, K., & Petzl-Erler, M. L. (2007). Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 314–321. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300003>
- Brogden, K., Chedid, L., Cutlip, R., Lehmkuhl, H., & Sacks, J. (1990). Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 51(2), 200–202.
- Brown, C., & Olander, H. (1987). Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bull.*, 57, 1–12. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10004897744/en/>
- Burnham, M. E., Koziol-White, C. J., Esnault, S., Bates, M. E., Evans, M. D., Bertics, P. J., & Denlinger, L. C. (2013). Human Airway Eosinophils Exhibit Preferential Reduction in STAT Signaling Capacity and Increased CISH Expression. *The Journal of Immunology*, 191(6), 2900–2906. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300297>
- Buxton, A., & Fraser, G. (1977). *Corynebacterium*. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.
- Carvalho, N. B., Oliveira, F. S., Durães, F. V., de Almeida, L. A., Flórido, M., Prata, L. O.,

- Caliari, M. V., Appelberg, R., & Oliveira, S. C. (2011). Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to *Mycobacterium avium* infection but plays no role in induction of Th1 responses. *Infection and Immunity*, 79(4), 1638–1646. <https://doi.org/10.1128/IAI.01030-10>
- Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T., & Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00089-5)
- Chaussabel, D., Semnani, R. T., McDowell, M. A., Sacks, D., Sher, A., & Nutman, T. B. (2003). Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood*, 102(2), 672–681. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3232>
- Chen, W., Yu, S. X., Zhou, F. H., Zhang, X. J., Gao, W. Y., Li, K. Y., Liu, Z. Z., Han, W. Y., & Yang, Y. J. (2019). DNA sensor IFI204 contributes to host defense against staphylococcus aureus infection in mice. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00474>
- Chirino-Zárraga, C., Scaramelli, A., & Rey-Valeirón, C. (2006). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research*, 65(1–2), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.06.017>
- Chunfa, L., Xin, S., Qiang, L., Sreevatsan, S., Yang, L., Zhao, D., & Zhou, X. (2017). The central role of IFI204 in IFN- β release and autophagy activation during *Mycobacterium bovis* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00169>
- Clavel, T., Lepage, P., & Charrier, C. (2014). *The Prokaryotes - The Family Corynebacteriaceae* (E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lor, E. Stackebrandt, & F. Thompson (eds.); 4th ed.). Springer Link. <https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9>
- Connor, K. M., Fontaine, M. C., Rudge, K., Baird, G. J., & Donachie, W. (2007). Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Research*, 38(4), 613–623. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007013>
- Connor, K. M., Quirie, M. M., Baird, G., & Donachie, W. (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2633–2637. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2633-2637.2000>
- Costa, L. R. R., Spier, S. J., & Hirsh, D. C. (1998). Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Veterinary Microbiology*, 62(2), 135–143. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00202-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00202-8)
- D'Afonseca, V., Prosdociami, F., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Moraes, P. M., Pena, I., Ortega, J. M., Teixeira, S., Oliveira, S. C., Coser, E. M., Oliveira, L. M., Corrêa de Oliveira, G., Meyer, R., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2010). Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological Research*, 165(4), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.05.009>
- da Costa Barnabé, N. N., Alves, J. R. A., de Farias, A. E. M., Alves, F. S. F., Faccioli-Martins, P. Y., Pinheiro, R. R., de Azevedo, S. S., & Alves, C. J. (2020). Assessment of caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation. *Semina: Ciências*

- Agrarias*, 41(6), 2655–2668. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6p2655>
- Dauffy, J., Mouchiroud, G., & Bourette, R. P. (2006). The interferon-inducible gene, Ifi204, is transcriptionally activated in response to M-CSF, and its expression favors macrophage differentiation in myeloid progenitor cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(1), 173–183. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205083>
- de la Fuente, R., de las Heras, M., Torrijos, C., Diez de Tejada, P., Pérez-Sancho, M., Carrión, F. J., Orden, J. A., & Dominguez-Bernal, G. (2017). Short communication: Isolation frequency of bacteria causing lymphadenitis and abscesses in small ruminants in central Spain. *Small Ruminant Research*, 154(4), 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.022>
- de Pinho, R. B., de Oliveira Silva, M. T., Bezerra, F. S. B., & Borsuk, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2287–2296. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11191-4>
- de Sá Guimarães, A., do Carmo, F. B., Pauletti, R. B., Seyffert, N., Ribeiro, D., Lage, A. P., Heinemann, M. B., Miyoshi, A., Azevedo, V., & Guimarães Gouveia, A. M. (2011). Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. *IIOAB Journal*, 2(2), 33–43.
- Dennis, S. M., & Bamford, V. W. (1966). The rôle of corynebacteria in perinatal lamb mortality. *The Veterinary Record*, 79(4), 105–108. <https://doi.org/10.1136/vr.79.4.105>
- Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., Maanen, K. Van, Bode, C. F., Baird, G., & Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 75(2), 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00217-0)
- Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, 37(2), 201–218. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Draber, P., Vonkova, I., Stepanek, O., Hrdinka, M., Kucova, M., Skopcova, T., Otahal, P., Angelisova, P., Horejsi, V., Yeung, M., Weiss, A., & Brdicka, T. (2011). SCIMP, a Transmembrane Adaptor Protein Involved in Major Histocompatibility Complex Class II Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31(22), 4550–4562. <https://doi.org/10.1128/mcb.05817-11>
- Drake, M. T., Clarke, B. L., Oursler, M. J., & Khosla, S. (2017). Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: Biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocrine Reviews*, 38(4), 325–350. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1114>
- Duque, G. A., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Ewing, B., Hillier, L. D., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Ferwerda, G., Kullberg, B. J., de Jong, D. J., Girardin, S. E., Langenberg, D. M. L., van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., Van der Meer, J. W. M., & Netea, M. G. (2007). Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), 1011–1018. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307147>
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61–98.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Flynn, J. A. L., & Chan, J. (2003). Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: Living with the enemy. *Current Opinion in Immunology*, 15(4), 450–455. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00075-X)
- Foley, J. E., Spier, S. J., Mihalyi, J., Drazenovich, N., & Leutenegger, C. M. (2004). Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. *American Journal of Veterinary Research*, 65(12), 1734–1737. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1734>
- Fontaine, M.C., & Baird, G. J. (2008). Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, 76(1–2), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.025>
- Fontaine, Michael C., Baird, G., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., & Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24(33–34), 5986–5996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.005>
- Fraser, G. (1961). Haemolytic activity of *Corynebacterium ovis*. *Nature*, 189(4760), 246. <https://doi.org/10.1038/189246a0>
- Fuentes, A. L., Millis, L., Vapenik, J., & Sigola, L. (2014). Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. *Journal of Surgical Research*, 189(2), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.024>
- Fujisawa, R., Mizuno, M., Katano, H., Otabe, K., Ozeki, N., Tsuji, K., Koga, H., & Sekiya, I. (2019). Cryopreservation in 95% serum with 5% DMSO maintains colony formation and chondrogenic abilities in human synovial mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12891-019-2700-3>
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, 327(5966), 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Geserick, P., Kaiser, F., Klemm, U., Kaufmann, S. H. E., & Zerrahn, J. (2004). Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *International Immunology*, 16(10), 1535–1548. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh155>
- Gonçalves, J. L., Tomazi, T., Barreiro, J. R., Braga, P. A. de C., Ferreira, C. R., Araújo Junior, J. P., Eberlin, M. N., & dos Santos, M. V. (2014). Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 173(1–2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.028>
- Guerrero, J. A. V., de Oca Jiménez, R. M., Acosta Dibarrat, J., León, F. H., Morales-Erasto, V., & Salazar, H. G. M. (2018). Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microbial Pathogenesis*, 117, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.031>
- Gururaj, K., Singh, D. D., Pawaiya, R. V. S., Andani, D., Gangwar, N. K., Mishra, A. K., Chaturvedi, V., & Kumar, A. (2018). Investigation of an outbreak of caseous lymphadenitis in goats. *Indian Journal of Small Ruminants (The)*, 24(1), 95. <https://doi.org/10.5958/0973-9718.2018.00008.9>
- Gutierrez, M. G. (2013). The Process of Phagosome Maturation. *Small GTPases*, 4(3), 148–158.
- Hamilton, J. A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 533–544. <https://doi.org/10.1038/nri2356>

- Hansen, K., Prabakaran, T., Laustsen, A., Jørgensen, S. E., Rahbæk, S. H., Jensen, S. B., Nielsen, R., Leber, J. H., Decker, T., Horan, K. A., Jakobsen, M. R., & Paludan, S. R. (2014). *Listeria monocytogenes* induces IFN β expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway. *The EMBO Journal*, *33*(15), 1654–1666. <https://doi.org/10.15252/embj.201488029>
- Hard, G. C. (1969). Electron microscopic examination of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Bacteriology*, *97*(3), 1480–1485. <https://doi.org/10.1128/jb.97.3.1480-1485.1969>
- Hinton, J. C. D., Hautefort, I., Eriksson, S., Thompson, A., & Rhen, M. (2004). Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(3), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.009>
- Holmes, R. K. (2000). Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(s1), S156–S167. <https://doi.org/10.1086/315554>
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & William, S. T. (1994). Regular, nonsporing gram- positive rods. In *bergey's manual of determinative bacteriology*.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., & Hacohen, N. (2001). The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components. *Science*, *294*(5543), 870–875. <https://doi.org/10.1126/science.294.5543.870>
- Huynh, K. K., Kay, J. G., Stow, J. L., & Grinstein, S. (2007). Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology*, *22*(6), 366–372. <https://doi.org/10.1152/physiol.00028.2007>
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., Van Rooijen, N., MacDonald, A. S., & Allen, J. E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation. *Science*, *332*(6035), 1284–1288. <https://doi.org/10.1126/science.1204351>
- Jenner, R. G., & Young, R. A. (2005). Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(4), 281–294. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1126>
- Jin, P., Wang, E., Provenzano, M., Deola, S., Selleri, S., Ren, J., Voiculescu, S., Stroncek, D., Panelli, M. C., & Marincola, F. M. (2006). Molecular signatures induced by interleukin-2 on peripheral blood mononuclear cells and T subsets. *Journal of Translational Medicine*, *4*, 1–23. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-26>
- Jo, E.-K. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *21*(3), 279–286. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b5d>
- Jolly, R. D. (1965). The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Comparative Pathology*, *75*(4), 417–431. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(65\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(65)90022-8)
- JONES, T. C., HUNT, R. D., & KING, N. W. (2000). Moléstias Causadas por Bactérias. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Patologia Veterinária. *Manole*, 6.ed.(São Paulo), 489–491.
- Jung, B. Y., Lee, S. H., Kim, H. Y., Byun, J. W., Shin, D. H., Kim, D., & Kwak, D. (2015). Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Tropical Animal Health and Production*, *47*(4), 657–661. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0773-z>
- Katakura, T., Miyazaki, M., Kobayashi, M., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2004). CCL17

- and IL-10 as Effectors That Enable Alternatively Activated Macrophages to Inhibit the Generation of Classically Activated Macrophages. *The Journal of Immunology*, 172(3), 1407–1413. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1407>
- Khamis, A., Raoult, D., & La Scola, B. (2004). rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 3925–3931. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004>
- Khounlotham, M., Subbian, S., Smith III, R., Cirillo, S. L. G., & Cirillo, J. D. (2009). Mycobacterium tuberculosis Interferes with the Response to Infection by Inducing the Host EphA2 Receptor. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(12), 1797–1806. <https://doi.org/10.1086/599096>
- Kovanen, P. E., & Leonard, W. J. (2004). Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gammac-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunological Reviews*, 202(1), 67–83. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00203.x>
- Ladds, P. (1993). *The Male Genital System*. Academic Press, 3.
- Lan, D. T. B. (1998). Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiology and Immunology*, 42(12), 863–870. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1998.tb02362.x>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Latif, N. A. A., Abdullah, F. F. J., Othman, A. M., Rina, A., Chung, E. L. T., Zamri-Saad, M., Saharee, A. A., Haron, A. W., & Lila, M. A. M. (2015). Isolation and detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the reproductive organs and associated lymph nodes of non-pregnant does experimentally inoculated through intradermal route in chronic form. *Veterinary World*, 8(7), 924–927. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.924-927>
- Lehmann, K. B., & Neumann, R. (1907). *Lehmann's Medizin, Handatlaten. X Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*. (Vol. 2).
- Levitz, S. M., & Golenbock, D. T. (2012). Beyond Empiricism: Informing Vaccine Development through Innate Immunity Research. *Cell*, 148(6), 1284–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.012>
- Li, Hexian, Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., Wang, Z., & Hu, S. (2018). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, 168(2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.015>
- Li, Hongchuan, & Anderson, S. K. (2018). Association of TNFRSF1B promoter polymorphisms with human disease: Further studies examining T-regulatory cells are required. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00443>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, J. X., & Leonard, W. J. (1997). Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 8(4), 313–332. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(97\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(97)00021-X)
- Lindner, R., & Friedel, C. C. (2012). A Comprehensive Evaluation of Alignment Algorithms

- in the Context of RNA-Seq. *PLoS ONE*, 7(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052403>
- Lopes Bastos, B. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 01(S4). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.s4-005>
- Luo, L., Bokil, N. J., Wall, A. A., Kapetanovic, R., Lansdaal, N. M., Marceline, F., Burgess, B. J., Tong, S. J., Guo, Z., Alexandrov, K., Ross, I. L., Hibbs, M. L., Stow, J. L., & Sweet, M. J. (2017). SCIMP is a transmembrane non-TIR TLR adaptor that promotes proinflammatory cytokine production from macrophages. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14133>
- Marino, S., Cilfone, N. A., Mattila, J. T., Linderman, J. J., Flynn, J. L., & Kirschner, D. E. (2015). Macrophage polarization drives granuloma outcome during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 83(1), 324–338. <https://doi.org/10.1128/IAI.02494-14>
- Marsh, J. W., Humphrys, M. S., & Myers, G. S. A. (2017). A laboratory methodology for dual RNA-sequencing of bacteria and their host cells in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01830>
- Martins, A., Han, J., & Kim, S. O. (2010). The multifaceted effects of granulocyte colony-stimulating factor in immunomodulation and potential roles in intestinal immune homeostasis. *IUBMB Life*, 62(8), 611–617. <https://doi.org/10.1002/iub.361>
- Mcgarvey, J. A., Wagner, D., & Bermudez, L. E. (2004). Differential gene expression in mononuclear phagocytes infected with pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Clinical and Experimental Immunology*, 136(3), 490–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02490.x>
- McKean, S. C., Davies, J. K., & Moore, R. J. (2007). Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 °C. *Research in Microbiology*, 158(3), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.12.006>
- Menzies, P. I., Hwang, Y. T., & Prescott, J. F. (2004). Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*, 100(1–2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.012>
- Merchant, I. A., & Packer, R. A. (1967). *Veterinary Bacteriology and Virology*. In *The Iowa State University Press: Iowa*. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb09107.x>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Minami, M., Shimizu, K., Okamoto, Y., Folco, E., Iwasaka, M. L., Feinberg, M. W., Aikawa, M., & Libby, P. (2008). Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF- κ B1 and attenuates macrophage activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9692–9703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709663200>
- Minozzi, G., Mattiello, S., Grosso, L., Crepaldi, P., Chessa, S., & Pagnacco, G. (2016). First insights in the genetics of caseous lymphadenitis in goats. *Italian Journal of Animal Science*, 16(1), 31–38. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1250610>
- Moody, D. E. (2001). Genomics techniques : An overview of methods for the study of gene expression. *American Society of Animal Science*, 79(1996), 128–135. <https://doi.org/10.2527/jas2001.79E-SupplE128x>
- Moore, R., Miyoshi, A., Pacheco, L. G. C., Seyffert, N., & Azevedo, V. (2010).

- Corynebacterium and Arcanobacterium. In *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition* (pp. 133–147). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch8>
- Morrow, B. J., Graham, J. E., & Curtiss, R. (1999). Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel *Salmonella typhimurium* fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the *Salmonella typhi* genome. *Infection and Immunity*, 67(10), 5106–5116. <https://doi.org/10.1007/s12297-008-0024-8>
- Muckle, C a, & Gyles, C. L. (1982). Characterization of strains of corynebacterium pseudotuberculosis. *Canadian Journal of Comparative Medicine (Gardenvale, Quebec)*, 46(2), 206–208. <https://doi.org/1320282>
- Muckle, CA, & Gyles, C. (1986). Exotoxic activities of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Current Microbiology*, 13(2), 57–60.
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(4), 557–563. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710409>
- Nairn, M., & Robertson, J. (1974). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. *Australian Veterinary Journal*, 50(12), 537–542.
- Nakamoto, M. (2000). Eph receptors and ephrins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32(1), 7–12. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00096-5)
- Nau, G. J., Richmond, J. F. L., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S., & Young, R. A. (2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1503–1508. <https://doi.org/10.1073/pnas.022649799>
- Nozaki, C. N., Faria, M. A. R., & Machado, T. M. M. (2000). Extirpação Cirúrgica Dos Abscessos. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 67(2), 187–189.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Osman, A. Y., Abdullah, F. F. J. B., & Saharee, A. A. b. (2012). Sero-Prevalence of Caseous Lymphadenitis Evaluated by Agar Gel Precipitation Test among Small Ruminant Flocks in East Coast Economic Regions in Peninsular Malaysia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(19), 3474–3480. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.3474.3480>
- Othman, A., Jesse, F., Lawan, A., Abba, A., Adza, R., & Saharee, A. (2014). Changes in serum progesterone and estrogen concentrations in non-pregnant boer does following experimental Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Veterinary Advances*, 4(5), 524–528.
- Pacheco, L. G. C., Pena, R. R., Castro, T. L. P., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., Frota, M. N. L., Oliveira, S. C., Meyer, R., Alves, F. S. F., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 480–486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>
- Paton, M. W., Buller, N. B., Rose, I. R., & Ellis, T. M. (2002). Effect of the interval between shearing and dipping on the spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 80(8), 494–496. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2002.tb12473.x>
- Paton, M. W., Walker, S. B., Rose, I. R., & Watt, G. F. (2003). Prevalence of caseous

- lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, 81(1–2), 91–95. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11443.x>
- Paule, B. J. ., Azevedo, V., Regis, L. ., Carminati, R., Bahia, C. ., Vale, V. L. ., Moura-Costa, L. ., Freire, S. ., Nascimento, I., Schaer, R., Goes, A. ., & Meyer, R. (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(3–4), 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00146-6)
- Pavan, M. E., Robles, C., Cairó, F. M., Marcellino, R., & Pettinari, M. J. (2012). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (rpoB). *Research in Veterinary Science*, 92(2), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.007>
- Peel, M. M., Palmer, G. G., Stacpoole, A. M., & Kerr, T. G. (1997). Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. *Clinical Infectious Diseases*, 24(2), 185–191. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.2.185>
- Pekelder, J. (2003). *Caseous lymphadenitis*. In: Martin, W.B.; Aitken, I.D. *Diseases of Sheep*. 3rd edn, Blackwell Science, Oxford.
- Pepin, M., Paton, M., & Hodgson, L. M. (1994). *Pathogenesis and epidemiology of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep*. 1(January 1994), 63–82.
- Pepin, M., Pittet, J. C., Oliver, M., & Gohin, I. (1994). Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(5), 666–670. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.666>
- Pepin, M., Sanchis, R., & Paton, M. (1999). La lymphadénite caséuse des ovins et des caprins. *Point Vétérinaire*, 30(196), 33–40.
- Pépin, M., Seow, H. F., Corner, L., Rothel, J. S., Hodgson, A. L., & Wood, P. R. (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Veterinary Research*, 28(2), 149–163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112737>
- Piontkowski, M. D., & Shivvers, D. W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(11), 1765–1768. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9621886>
- Pixley, F. J., & Stanley, E. R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: Complexity in action. *Trends in Cell Biology*, 14(11), 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.016>
- Pugh, D., & Baird, N. (2012). *Sheep & Goat Medicine-E-Book*.
- RADOSTITS, O., GAY, C., Gay, C., Hinchcliff, K., & Constable, P. (2007). A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats: veterinary medicine. *Veterinary Medicine*, 10(5), 2045–2050.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. In *Editora Guanabara Koogan S.A.: Vol. 9.ed.* (Issue Rio de Janeiro).
- Rappuoli, R. (2000). Pushing the limits of cellular microbiology: Microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13467–13469. <https://doi.org/10.1073/pnas.010505497>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package

- for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- Selim, S. A. (2001). Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(4), 241–258. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00451.x>
- Seyffert, N., Guimarães, A. S., Pacheco, L. G. C., Portela, R. W., Bastos, B. L., Dorella, F. A., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Gouveia, A. M. G., Meyer, R., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2010). High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*, 88(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.002>
- Shin, D., Song, Y., Byun, J., Kim, H., Kim, H., Woo, G., Lee, O., & Jung, B. (2010). Caseous lymphadenitis by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a Saanen dairy goat (*Capra hircus aegagrus*). *Korean Journal of Veterinary Research*, 50(1), 25–28.
- Silva, M. T. (2011). Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(5), 675–683. <https://doi.org/10.1189/jlb.0910536>
- Simmons, D. P., Canaday, D. H., Liu, Y., Li, Q., Huang, A., Boom, W. H., & Harding, C. V. (2010). Mycobacterium tuberculosis and TLR2 Agonists Inhibit Induction of Type I IFN and Class I MHC Antigen Cross Processing by TLR9. *The Journal of Immunology*, 185(4), 2405–2415. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904005>
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>
- Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, 5(4), 156–161. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01005-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01005-6)
- Songer, J. G. (2005). *The Genus Corynebacterium -Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Elsevier Saunders.
- Souza, M. de F., de Carvalho, A. Q., Garino, F., & Riet-Correa, F. (2011). Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(3), 224–230. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000300007>
- Stanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., & Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 62(1), 38–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9442938>
- Stefańska, I., Gieryńska, M., Rzewuska, M., & Binek, M. (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(1), 143–149. http://awsassets.wwfz.panda.org/downloads/earth_summit_2012_v3.pdf%0Ahttp://hdl.handle.net/10239/131%0Ahttps://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones/jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion_para_el_aprendizaje_Perspectiva_alumnos.pdf%0Ahttps://ww
- Stefańska, Ilona, Rzewuska, M., & Binek, M. (2008). Evaluation of three methods for DNA fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from goats in

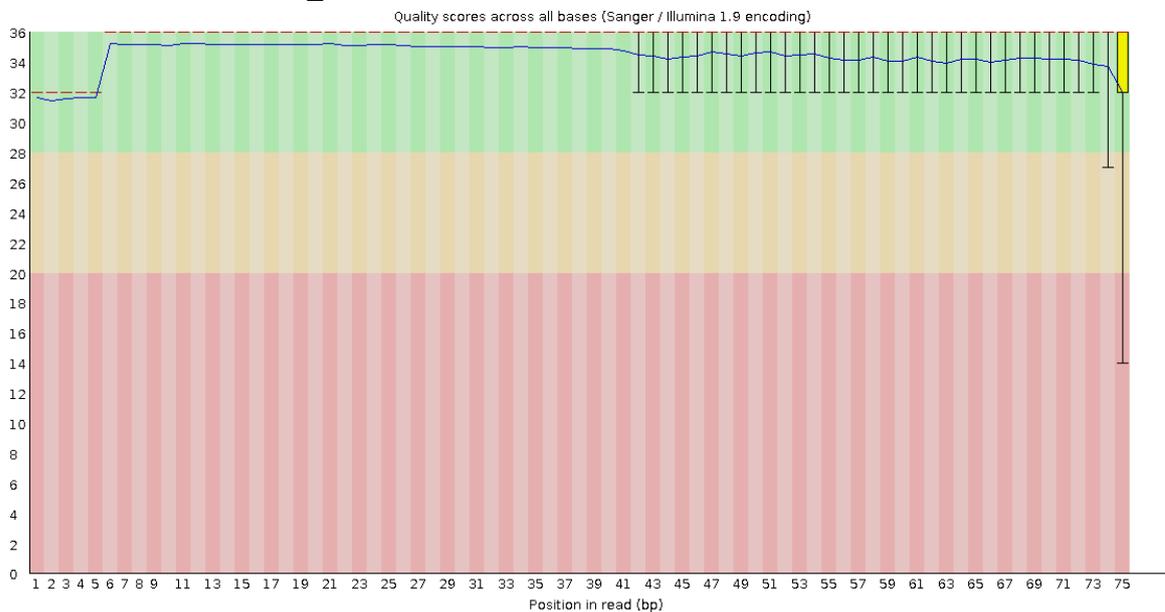
- Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2), 105–112.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18646397>
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I Interferons in Host Defense. *Immunity*, 25(3), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.007>
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS ONE*, 13(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>
- Tapping, R. I., & Tobias, P. S. (2003). Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *Journal of Endotoxin Research*, 9(4), 264–268. <https://doi.org/10.1179/096805103225001477>
- Tarazona, S., Furió-Tarí, P., Turrà, D., Di Pietro, A., Nueda, M. J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Research*, 43(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv711>
- Tashjian, J. J., & Campbell, S. G. (1983). Interaction between caprine macrophages and corynebacterium pseudotuberculosis: an electron microscopic study. *American Journal of Veterinary Research*, 44(4), 690–693. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6869967>
- Thirunavukkarasu, S., De Silva, K., Whittington, R. J., & Plain, K. M. (2013). In vivo and in vitro expression pattern of Toll-like receptors in Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156(1–2), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.08.008>
- Thongkwow, S., Pooiripinyo, N., Pongkornkumpon, N., Saengsakchai, S., Klinkhiew, N., Chalatan, T., Kanistanon, K., Lerk-U-Suke, S., & Rerkyusuke, S. (2019). Distribution and risk factors of clinical caseous lymphadenitis in small-holder goat herds in northeastern Thailand. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 49(4), 343–351.
- Umer, M., Sciences, M., Yusuf Abba, P., Firdaus Jesse Abdullah, F., Monther Mohammed Saleh, W., Wahid Haron, A., Aziz Saharee, A., Hasan Ali Baiee, F., Umar Hambali, I., Sharif, A., Faez Firdaus Jesse Abdullah, C., Abba, Y., & Bin Ariff, A. (2017). Caseous lymphadenitis in small ruminants: An overview on reproductive implications. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 2(2), 23–31. www.veterinarypaper.com
- Unanue, E. R., Beller, D. I., Calderon, J., Kiely, J. M., & Stadecker, M. J. (1976). Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. *American Journal of Pathology*, 85(2), 465–478.
- van Zuylen, W. J., Garceau, V., Idris, A., Schroder, K., Irvine, K. M., Lattin, J. E., Ovchinnikov, D. A., Perkins, A. C., Cook, A. D., Hamilton, J. A., Hertzog, P. J., Stacey, K. J., Kellie, S., Hume, D. A., & Sweet, M. J. (2011). Macrophage activation and differentiation signals regulate Schlafen-4 gene expression: Evidence for Schlafen-4 as a modulator of myelopoiesis. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015723>
- Vance, R. E., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (2009). Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host and Microbe*, 6(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>
- Veschi, J. L. A. (2011). Manejo sanitário de doenças infecciosas. *Produção de Caprinos e Ovinos No Semiárido*, 323–354.
- WALKER, J., JACKSON, H., BRANDON, M. R., & MEEUSEN, E. (1991). Lymphocyte

- subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 86(1), 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb05766.x>
- Wang, L., Feng, Z., Wang, X., Wang, X., & Zhang, X. (2009). DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 26(1), 136–138. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp612>
- Westermann, A. J., Gorski, S. A., & Vogel, J. (2012). Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 618–630.
- Williamson, L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 17(2), 359–371. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30033-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30033-5)
- Williamson, P., & Nairn, M. E. (1980). Lesions Caused By *Corynebacterium Pseudotuberculosis* in the Scrotum of Rams. *Australian Veterinary Journal*, 56(10), 496–498. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1980.tb02565.x>
- Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
- Wynn, T., & Barron, L. (2010). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(03), 245–257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>
- Yitagesu, E., Alemnew, E., Olani, A., Asfaw, T., & Demis, C. (2020). Survival Analysis of Clinical Cases of Caseous Lymphadenitis of Goats in North Shoa, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8822997>
- Yozwiak, M. L., & Songer, J. G. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*, 54(3), 392–397. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8498741>

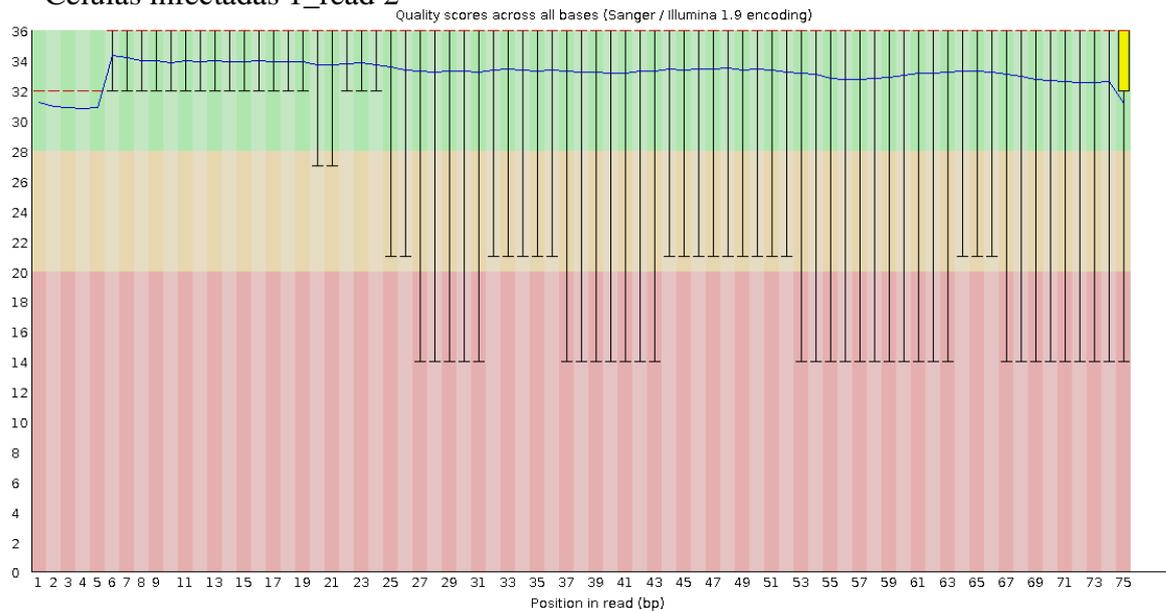
8. APÊNDICE

Apêndice A – Qualidade das leituras brutas do sequenciamento das células infectadas e das células controle

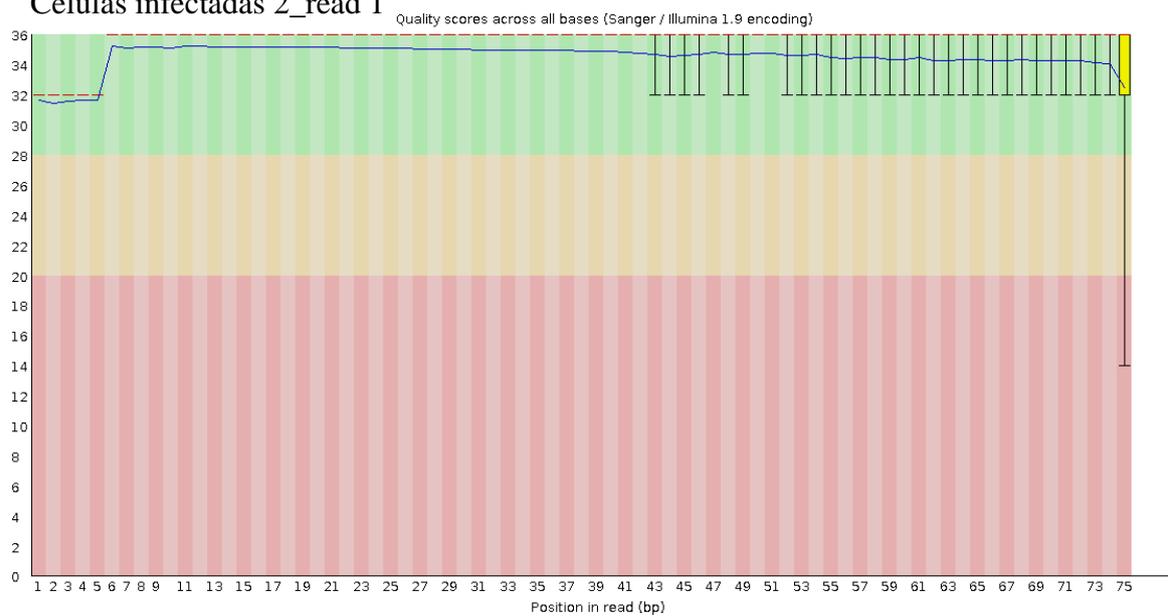
Células infectadas 1_read 1



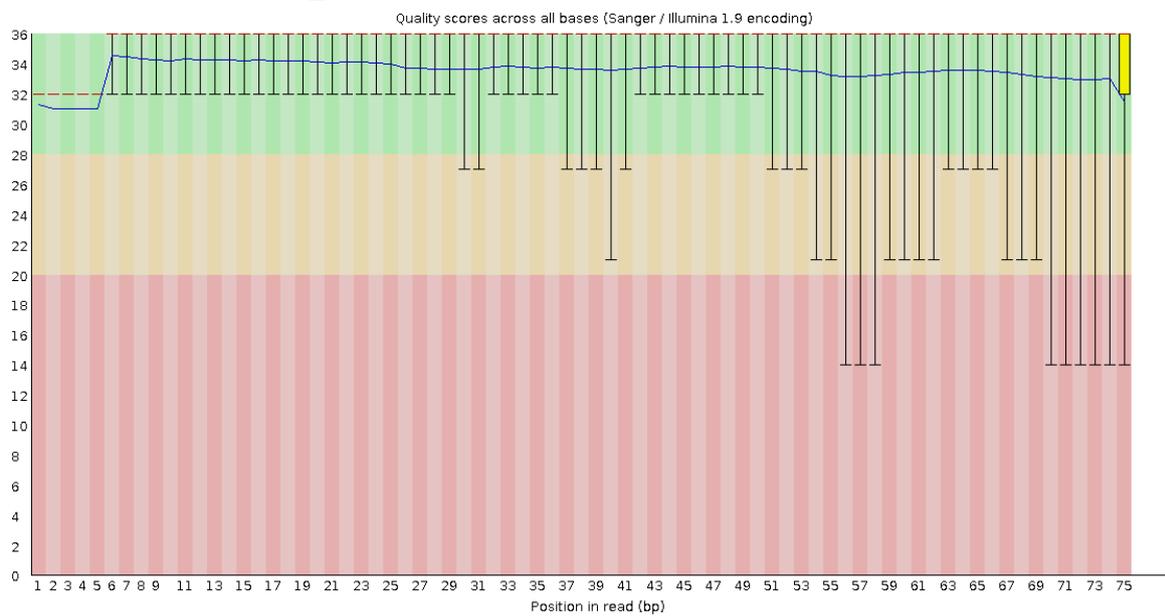
Células infectadas 1_read 2



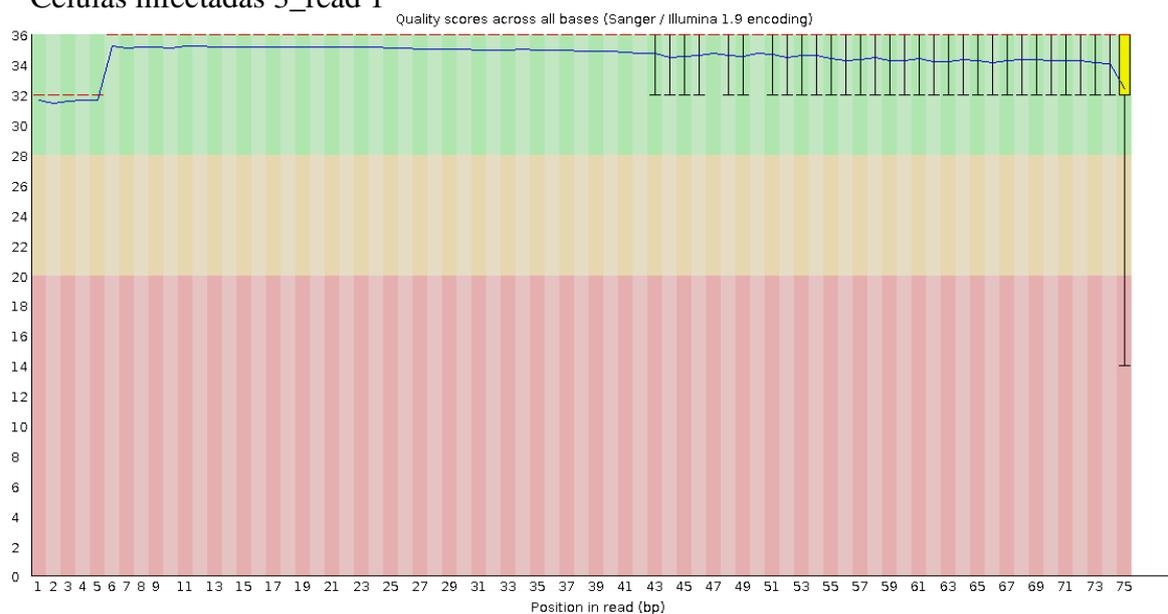
Células infectadas 2_read 1



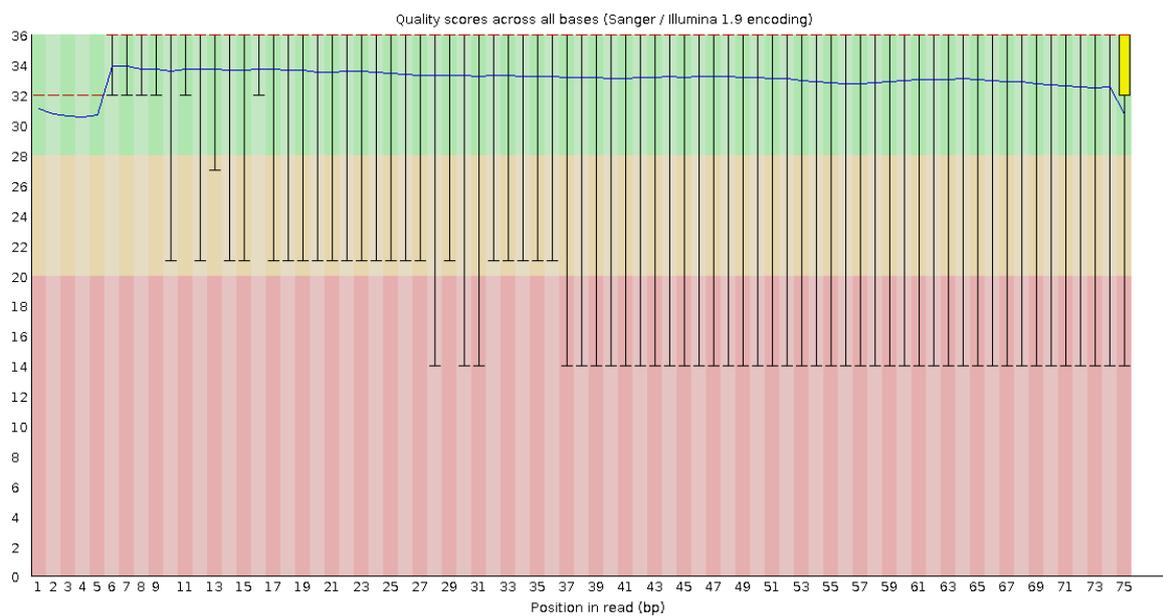
Células infectadas 2_read 2



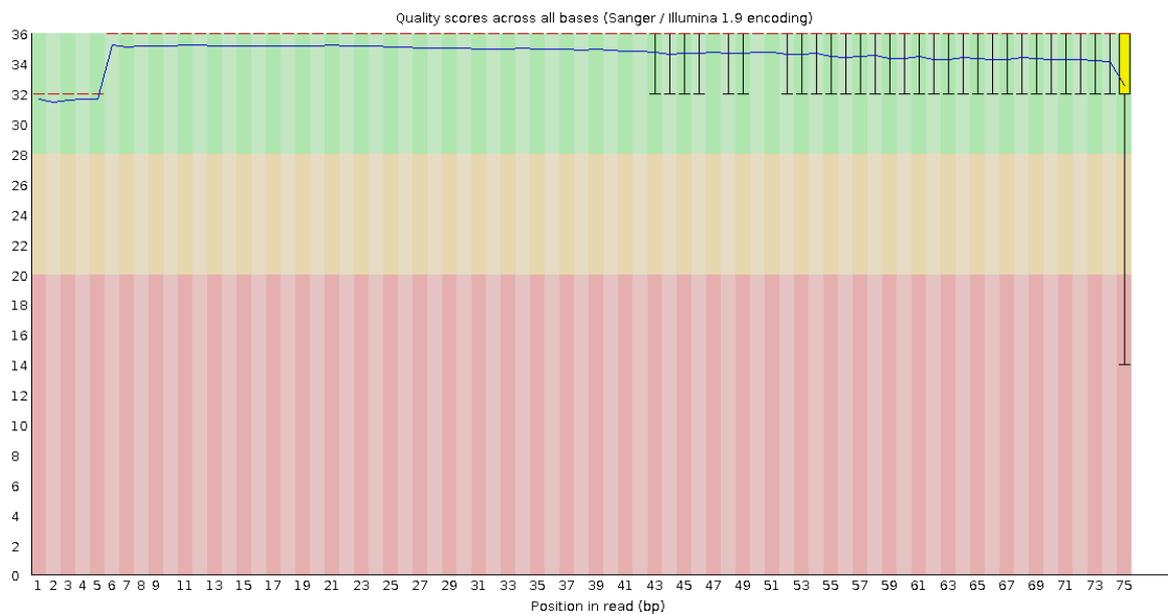
Células infectadas 3_read 1



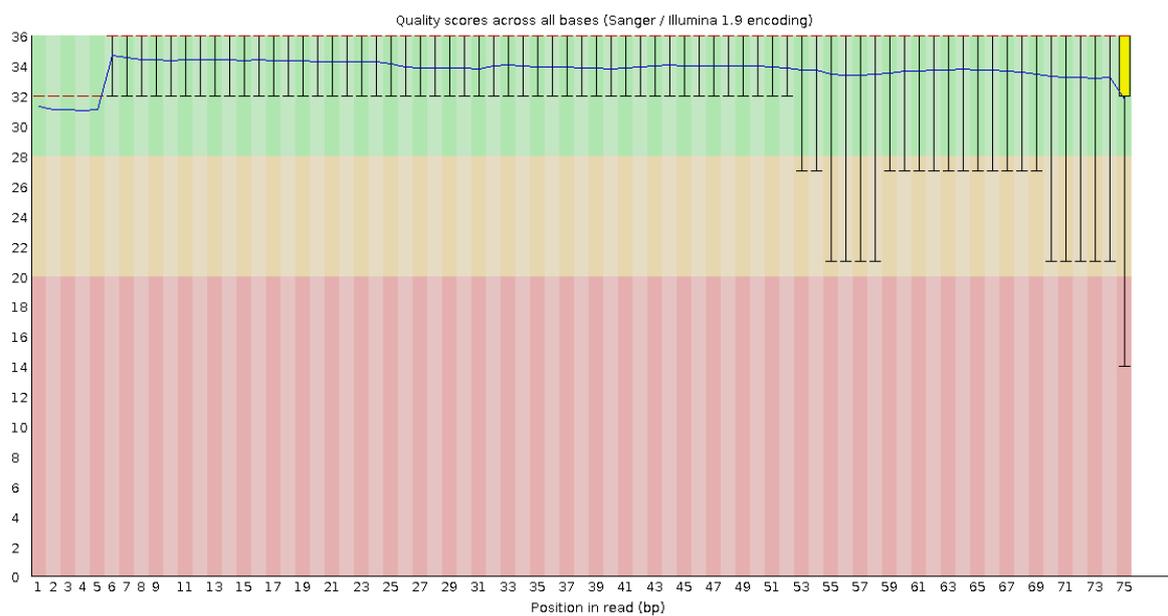
Células infectadas 3_read 2



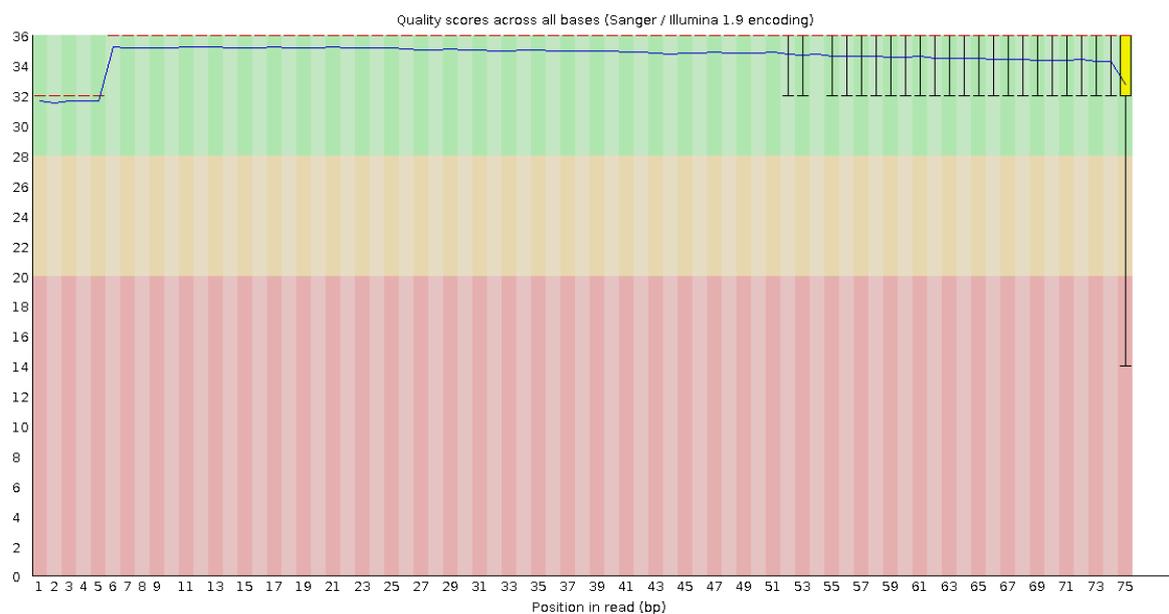
Células controle 1_read 1



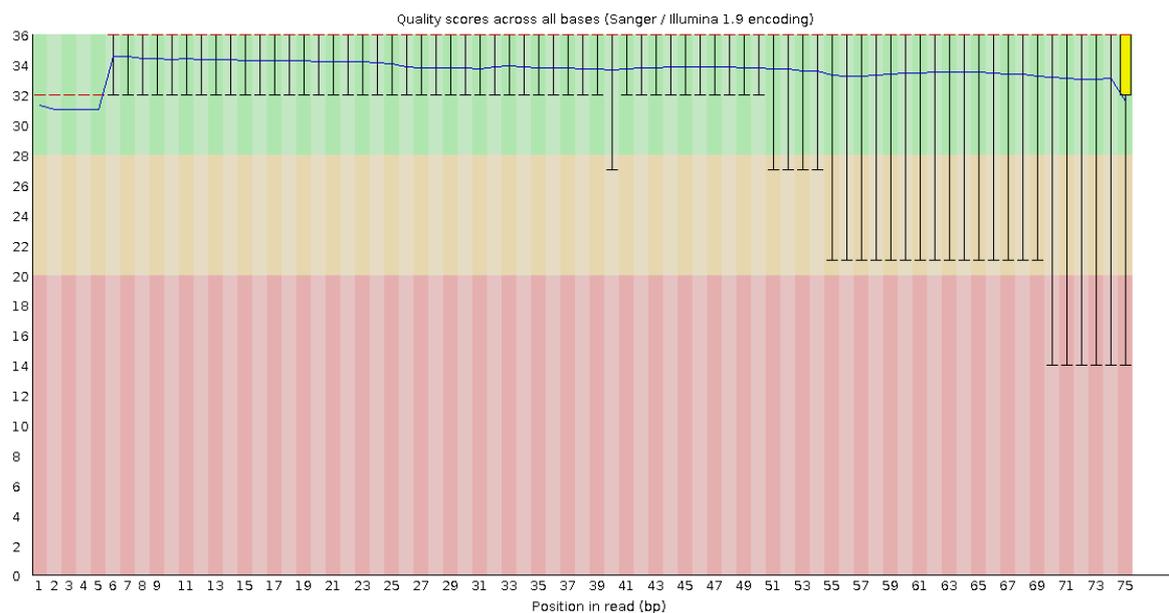
Células controle 1_read 2



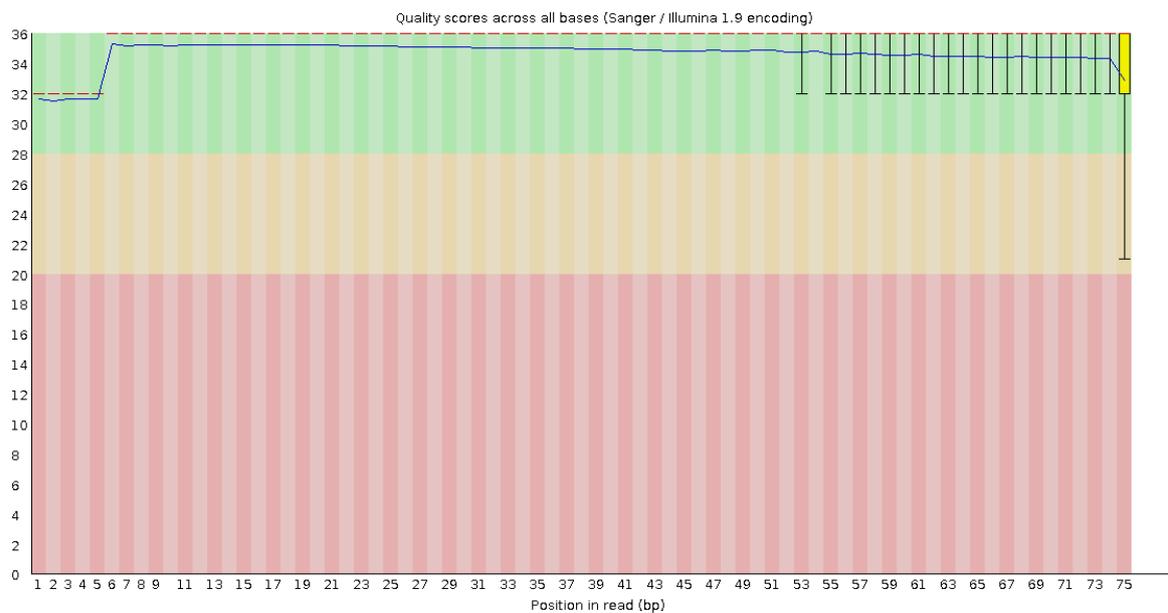
Células controle 2_read 1



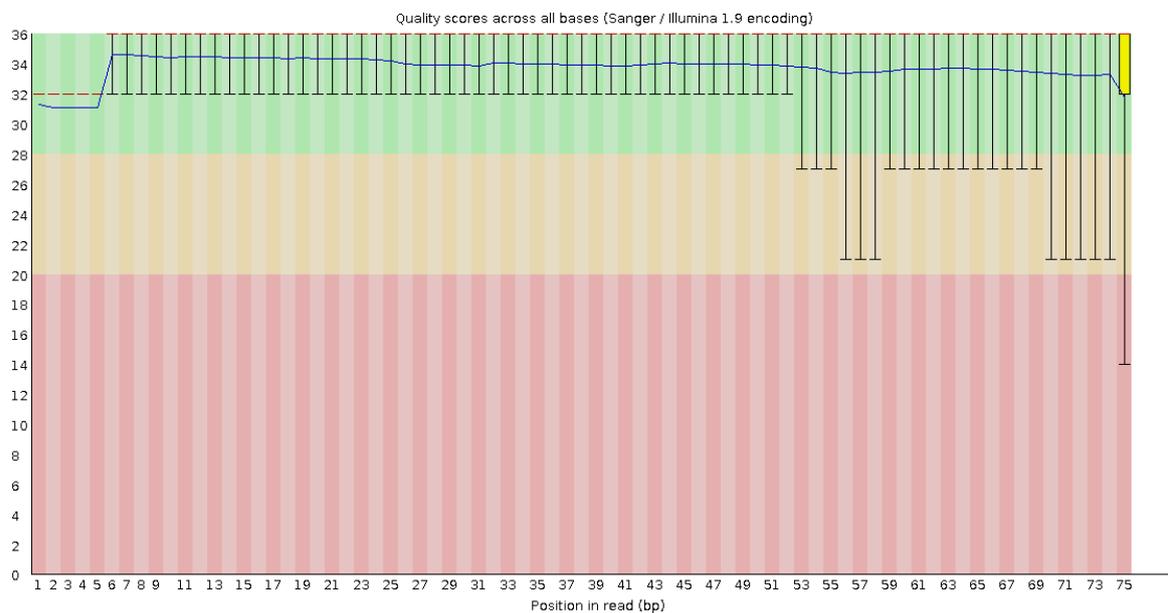
Células controle 2_read 2



Células controle 3_read 1



Células controle 3_read 2



Apêndice B – Lista de genes induzidos e reprimidos nas células infectadas

Genes induzidos

gene_id	logFC	PValue	FDR
ENSMUSG00000038067	4,461101327	0	0
ENSMUSG00000032578	3,481132492	3,06E-35	1,37E-33
ENSMUSG00000028268	3,159632596	6,16E-41	3,94E-39
ENSMUSG00000025731	3,043818352	1,05E-30	3,47E-29
ENSMUSG00000040253	2,995504751	2,25E-116	2,65E-113
ENSMUSG00000043207	2,871573503	3,28E-317	1,93E-313
ENSMUSG00000021123	2,739405197	1,13E-43	8,33E-42
ENSMUSG00000000204	2,716901423	2,28E-181	6,69E-178
ENSMUSG00000014599	2,711730263	1,37E-65	2,60E-63
ENSMUSG00000090231	2,702278095	7,72E-31	2,60E-29
ENSMUSG00000000386	2,644533325	6,17E-26	1,47E-24
ENSMUSG00000068246	2,622497646	6,32E-35	2,81E-33
ENSMUSG00000013033	2,544280913	2,68E-111	2,63E-108
ENSMUSG00000033287	2,493228316	4,71E-41	3,03E-39
ENSMUSG00000026822	2,405725695	8,38E-97	4,48E-94
ENSMUSG00000029298	2,387478712	4,69E-29	1,40E-27
ENSMUSG00000039178	2,352088131	9,60E-32	3,50E-30
ENSMUSG00000034394	2,345587547	4,02E-51	4,07E-49
ENSMUSG00000037921	2,34424609	4,57E-97	2,56E-94
ENSMUSG00000039146	2,340287581	8,30E-77	2,32E-74
ENSMUSG00000057346	2,328848573	5,47E-28	1,50E-26
ENSMUSG00000020413	2,312360641	8,04E-40	4,80E-38
ENSMUSG00000046152	2,310133723	9,73E-31	3,24E-29
ENSMUSG00000024486	2,275827207	2,85E-63	4,73E-61
ENSMUSG00000027514	2,266627946	2,00E-127	3,93E-124
ENSMUSG00000020641	2,244226752	2,78E-73	6,81E-71
ENSMUSG00000019808	2,197203001	1,05E-24	2,26E-23
ENSMUSG00000029561	2,148616999	2,66E-126	4,47E-123
ENSMUSG00000074896	2,136330573	2,25E-33	8,87E-32
ENSMUSG00000052373	2,114211279	3,70E-24	7,61E-23
ENSMUSG00000117964	2,110795217	1,14E-18	1,48E-17
ENSMUSG00000045932	2,107797104	4,31E-101	2,82E-98
ENSMUSG00000032487	2,082372969	1,44E-185	5,64E-182
ENSMUSG00000034126	2,046494434	9,05E-59	1,24E-56
ENSMUSG00000043263	2,019686552	2,47E-40	1,52E-38
ENSMUSG00000017737	2,009815019	4,50E-65	8,28E-63
ENSMUSG00000086331	1,991598553	1,28E-21	2,15E-20
ENSMUSG00000008307	1,984322263	8,03E-31	2,70E-29
ENSMUSG00000027398	1,96552216	1,12E-24	2,41E-23
ENSMUSG00000021815	1,943644388	2,54E-18	3,20E-17
ENSMUSG00000030921	1,920438113	1,11E-110	1,00E-107
ENSMUSG00000064427	1,911700119	7,73E-30	2,39E-28

ENSMUSG00000035279	1,91010031	1,52E-54	1,83E-52
ENSMUSG00000039236	1,905142721	8,35E-57	1,08E-54
ENSMUSG00000006445	1,90485584	3,96E-54	4,56E-52
ENSMUSG00000015016	1,903268365	4,92E-30	1,56E-28
ENSMUSG00000056832	1,900396802	1,11E-24	2,40E-23
ENSMUSG00000025494	1,891905008	1,13E-32	4,30E-31
ENSMUSG00000019971	1,88423202	5,74E-85	2,18E-82
ENSMUSG00000032295	1,875413834	1,62E-134	3,82E-131
ENSMUSG00000022548	1,867608798	1,22E-23	2,43E-22
ENSMUSG00000034171	1,866398687	2,53E-61	3,97E-59
ENSMUSG00000022742	1,859206785	5,38E-78	1,62E-75
ENSMUSG00000108126	1,858018361	7,59E-19	1,01E-17
ENSMUSG00000022844	1,846834774	5,24E-78	1,62E-75
ENSMUSG00000034292	1,844198894	1,42E-20	2,15E-19
ENSMUSG00000023341	1,843514625	3,78E-66	7,55E-64
ENSMUSG00000025495	1,84339099	1,93E-85	7,84E-83
ENSMUSG00000107215	1,840294105	4,07E-15	3,83E-14
ENSMUSG00000024350	1,835465066	3,31E-63	5,41E-61
ENSMUSG00000058427	1,835271457	2,40E-83	8,54E-81
ENSMUSG00000078517	1,834762645	1,68E-87	7,90E-85
ENSMUSG00000074652	1,829001127	8,23E-28	2,24E-26
ENSMUSG00000046329	1,825607328	1,99E-34	8,48E-33
ENSMUSG00000062075	1,823091374	2,01E-41	1,32E-39
ENSMUSG00000041298	1,818975496	5,32E-38	2,90E-36
ENSMUSG00000006930	1,81875709	7,52E-46	5,98E-44
ENSMUSG00000041936	1,816016845	4,74E-109	3,72E-106
ENSMUSG00000028599	1,811303682	1,90E-124	2,80E-121
ENSMUSG00000067567	1,806284531	1,40E-34	6,03E-33
ENSMUSG00000036676	1,783583704	1,31E-33	5,37E-32
ENSMUSG00000107320	1,767631827	7,30E-11	4,18E-10
ENSMUSG00000103558	1,763964519	8,78E-17	9,71E-16
ENSMUSG00000046056	1,761511598	4,64E-19	6,30E-18
ENSMUSG00000060166	1,7592357	2,14E-33	8,52E-32
ENSMUSG00000083554	1,744350043	3,13E-19	4,33E-18
ENSMUSG00000094463	1,743953135	5,68E-37	2,90E-35
ENSMUSG00000045349	1,730747939	1,77E-16	1,92E-15
ENSMUSG00000070327	1,727947329	2,36E-71	5,66E-69
ENSMUSG00000089774	1,724415062	8,65E-78	2,54E-75
ENSMUSG00000058515	1,722307329	9,31E-18	1,11E-16
ENSMUSG00000001524	1,720535283	8,61E-43	6,14E-41
ENSMUSG00000057181	1,71125252	2,93E-40	1,80E-38
ENSMUSG00000074899	1,696523931	7,16E-17	7,97E-16
ENSMUSG00000105954	1,693811005	1,13E-24	2,41E-23
ENSMUSG00000028364	1,683228403	1,03E-15	1,04E-14
ENSMUSG00000085334	1,681828401	1,51E-14	1,34E-13
ENSMUSG00000040721	1,677339946	5,96E-36	2,83E-34
ENSMUSG00000020321	1,669410954	7,11E-64	1,25E-61
ENSMUSG00000001168	1,668696147	5,40E-10	2,77E-09

ENSMUSG00000020770	1,666950195	3,69E-70	8,19E-68
ENSMUSG00000031433	1,660783206	2,47E-28	6,91E-27
ENSMUSG00000046434	1,659220588	2,58E-48	2,26E-46
ENSMUSG00000102496	1,658447411	8,60E-13	6,26E-12
ENSMUSG00000115276	1,655992877	1,48E-08	6,32E-08
ENSMUSG00000029592	1,655406298	9,05E-47	7,43E-45
ENSMUSG00000111394	1,654990997	1,09E-49	1,00E-47
ENSMUSG00000105572	1,648134059	7,06E-10	3,58E-09
ENSMUSG00000116908	1,647702649	1,61E-13	1,27E-12
ENSMUSG00000020234	1,638300373	3,07E-24	6,36E-23
ENSMUSG00000097090	1,627524737	5,81E-23	1,08E-21
ENSMUSG00000097572	1,626806548	5,34E-21	8,45E-20
ENSMUSG00000035266	1,622734006	4,81E-33	1,87E-31
ENSMUSG00000027318	1,621672487	3,65E-20	5,37E-19
ENSMUSG00000089417	1,610386468	6,95E-06	2,03E-05
ENSMUSG00000047284	1,607992595	9,57E-61	1,42E-58
ENSMUSG00000072572	1,607154063	4,22E-17	4,80E-16
ENSMUSG00000053835	1,60354506	2,35E-107	1,73E-104
ENSMUSG00000084968	1,601146314	3,15E-16	3,34E-15
ENSMUSG00000038508	1,598701095	1,74E-12	1,22E-11
ENSMUSG00000001123	1,598457619	4,19E-97	2,46E-94
ENSMUSG00000057424	1,598318101	1,05E-08	4,59E-08
ENSMUSG00000070047	1,593510094	1,46E-59	2,07E-57
ENSMUSG00000017740	1,59111651	2,44E-22	4,35E-21
ENSMUSG00000028093	1,590581075	1,63E-75	4,35E-73
ENSMUSG00000022231	1,588802366	1,29E-64	2,30E-62
ENSMUSG00000018906	1,588800885	4,30E-16	4,51E-15
ENSMUSG00000030409	1,587276488	1,05E-31	3,80E-30
ENSMUSG00000048120	1,581883949	6,05E-17	6,81E-16
ENSMUSG00000089235	1,57950032	8,19E-07	2,76E-06
ENSMUSG00000020658	1,579011128	2,59E-69	5,64E-67
ENSMUSG00000019845	1,578669882	1,58E-19	2,24E-18
ENSMUSG00000021822	1,576903911	1,43E-111	1,52E-108
ENSMUSG00000107962	1,565619546	2,27E-12	1,57E-11
ENSMUSG00000048445	1,560874824	9,85E-30	3,04E-28
ENSMUSG00000034156	1,55462988	3,85E-81	1,29E-78
ENSMUSG00000059540	1,553614624	7,80E-25	1,71E-23
ENSMUSG00000017652	1,552889267	2,84E-31	9,82E-30
ENSMUSG00000044617	1,552427352	4,98E-17	5,62E-16
ENSMUSG00000092981	1,551385694	4,54E-14	3,83E-13
ENSMUSG00000027111	1,550380753	8,46E-28	2,29E-26
ENSMUSG00000037762	1,549064667	2,58E-23	4,98E-22
ENSMUSG00000019734	1,539425679	3,13E-12	2,13E-11
ENSMUSG00000005681	1,537618957	6,76E-15	6,21E-14
ENSMUSG00000087528	1,53618387	5,10E-15	4,75E-14
ENSMUSG00000012126	1,529135227	5,60E-36	2,67E-34
ENSMUSG00000053332	1,526926935	4,42E-43	3,19E-41
ENSMUSG00000115017	1,512441336	8,61E-21	1,33E-19

ENSMUSG00000029798	1,510185938	2,49E-44	1,89E-42
ENSMUSG00000041406	1,508224785	1,35E-22	2,46E-21
ENSMUSG00000032561	1,507593382	3,34E-11	1,99E-10
ENSMUSG00000113328	1,505237048	7,78E-16	7,93E-15
ENSMUSG00000112148	1,500997174	2,37E-36	1,17E-34
ENSMUSG00000000531	1,496120376	8,16E-12	5,29E-11
ENSMUSG00000024869	1,493741108	2,02E-15	1,98E-14
ENSMUSG00000092341	1,491662896	1,28E-10	7,10E-10
ENSMUSG00000102602	1,488762535	4,57E-13	3,42E-12
ENSMUSG00000036775	1,488711788	6,76E-23	1,25E-21
ENSMUSG00000117269	1,486833078	1,92E-27	5,05E-26
ENSMUSG00000034855	1,48652835	1,80E-19	2,55E-18
ENSMUSG00000091144	1,485425553	1,18E-13	9,48E-13
ENSMUSG00000024228	1,485091914	9,22E-19	1,21E-17
ENSMUSG00000052631	1,481064245	1,70E-42	1,20E-40
ENSMUSG00000015568	1,479513087	5,71E-121	7,46E-118
ENSMUSG00000027800	1,474344178	2,81E-12	1,92E-11
ENSMUSG00000090862	1,471299003	4,95E-15	4,62E-14
ENSMUSG00000030336	1,467651316	7,28E-14	5,97E-13
ENSMUSG00000050382	1,467214055	4,33E-11	2,54E-10
ENSMUSG00000033880	1,46237791	8,61E-86	3,75E-83
ENSMUSG00000033987	1,462205829	1,09E-11	6,96E-11
ENSMUSG00000109471	1,461957281	5,65E-10	2,89E-09
ENSMUSG00000092216	1,45455006	3,63E-20	5,36E-19
ENSMUSG00000085894	1,452193626	7,38E-14	6,03E-13
ENSMUSG00000027322	1,451994895	4,25E-94	2,17E-91
ENSMUSG00000090210	1,451158204	1,61E-14	1,43E-13
ENSMUSG00000094410	1,449563673	1,30E-33	5,37E-32
ENSMUSG00000025736	1,448230873	4,03E-23	7,63E-22
ENSMUSG00000034949	1,446012148	9,88E-32	3,59E-30
ENSMUSG00000029559	1,443359076	1,51E-31	5,38E-30
ENSMUSG00000058558	1,43522657	2,55E-23	4,92E-22
ENSMUSG00000029068	1,433632002	1,21E-109	1,02E-106
ENSMUSG00000062169	1,433271235	9,20E-45	7,03E-43
ENSMUSG00000040661	1,429461776	4,98E-65	9,01E-63
ENSMUSG00000032579	1,425050065	2,98E-21	4,80E-20
ENSMUSG00000016409	1,418393977	2,46E-39	1,43E-37
ENSMUSG00000022421	1,417769285	3,44E-33	1,35E-31
ENSMUSG00000032690	1,414741078	3,51E-85	1,38E-82
ENSMUSG00000085028	1,413697993	7,89E-17	8,76E-16
ENSMUSG00000063894	1,40907419	8,59E-14	7,00E-13
ENSMUSG00000057135	1,409025736	6,58E-55	8,07E-53
ENSMUSG00000034194	1,408760202	1,61E-13	1,27E-12
ENSMUSG00000033952	1,408101735	8,77E-71	1,98E-68
ENSMUSG00000095332	1,399836671	5,31E-13	3,95E-12
ENSMUSG00000097636	1,399032902	1,32E-12	9,38E-12
ENSMUSG00000009563	1,398298836	8,36E-51	8,34E-49
ENSMUSG00000026535	1,396751226	1,52E-43	1,11E-41

ENSMUSG00000022386	1,39399365	1,79E-30	5,81E-29
ENSMUSG00000034459	1,393091015	1,77E-33	7,12E-32
ENSMUSG00000035692	1,390422697	2,12E-37	1,12E-35
ENSMUSG00000041552	1,390107686	3,44E-19	4,75E-18
ENSMUSG00000052125	1,389789296	3,44E-25	7,79E-24
ENSMUSG00000103928	1,384228191	5,97E-11	3,44E-10
ENSMUSG00000039646	1,384076129	6,33E-10	3,23E-09
ENSMUSG00000108414	1,383523209	3,75E-37	1,96E-35
ENSMUSG00000005150	1,381036323	3,38E-21	5,44E-20
ENSMUSG00000026955	1,380416996	8,66E-22	1,48E-20
ENSMUSG00000022802	1,379100221	2,34E-40	1,45E-38
ENSMUSG00000028838	1,371834857	3,30E-34	1,39E-32
ENSMUSG00000089917	1,37033869	4,94E-61	7,65E-59
ENSMUSG00000028655	1,368691772	7,08E-17	7,89E-16
ENSMUSG00000085316	1,366194641	2,14E-21	3,50E-20
ENSMUSG00000104344	1,361950404	1,79E-11	1,11E-10
ENSMUSG00000055945	1,361782446	8,58E-13	6,25E-12
ENSMUSG00000024925	1,361225381	1,61E-21	2,67E-20
ENSMUSG00000039531	1,360962856	7,65E-30	2,37E-28
ENSMUSG00000015947	1,357972584	3,77E-81	1,29E-78
ENSMUSG00000042082	1,357059145	3,00E-91	1,47E-88
ENSMUSG00000111600	1,355975603	3,17E-14	2,72E-13
ENSMUSG00000078816	1,353548449	3,22E-24	6,65E-23
ENSMUSG00000084911	1,351622302	2,00E-10	1,09E-09
ENSMUSG00000034445	1,350832331	6,48E-30	2,03E-28
ENSMUSG00000035042	1,350625956	1,39E-28	3,99E-27
ENSMUSG00000014786	1,347516713	3,07E-62	4,88E-60
ENSMUSG00000023050	1,344379515	4,21E-12	2,83E-11
ENSMUSG00000022228	1,342709857	1,25E-27	3,34E-26
ENSMUSG00000015377	1,342492175	4,50E-28	1,24E-26
ENSMUSG00000042684	1,335873183	7,86E-51	7,91E-49
ENSMUSG00000051034	1,335559341	1,21E-08	5,24E-08
ENSMUSG00000025743	1,331311672	1,68E-65	3,13E-63
ENSMUSG00000006288	1,328278764	2,12E-18	2,68E-17
ENSMUSG00000020460	1,326624389	4,72E-23	8,86E-22
ENSMUSG00000109243	1,324645487	9,33E-09	4,10E-08
ENSMUSG00000038390	1,324154947	1,54E-30	5,03E-29
ENSMUSG00000029596	1,321906164	2,94E-17	3,38E-16
ENSMUSG00000050605	1,319255765	4,45E-14	3,77E-13
ENSMUSG00000084038	1,315792967	3,14E-11	1,88E-10
ENSMUSG00000097418	1,315512307	3,79E-13	2,86E-12
ENSMUSG00000037366	1,314394369	8,95E-21	1,38E-19
ENSMUSG00002076083	1,311702117	3,53E-14	3,02E-13
ENSMUSG00000043833	1,309063362	2,92E-10	1,55E-09
ENSMUSG00000057133	1,302873341	6,57E-61	9,91E-59
ENSMUSG00000021993	1,302518631	1,25E-46	1,01E-44
ENSMUSG00000001131	1,301560421	6,19E-15	5,71E-14
ENSMUSG00000032850	1,301171732	1,45E-12	1,02E-11

ENSMUSG00000028969	1,300289467	1,11E-24	2,40E-23
ENSMUSG00000028037	1,298603714	1,30E-85	5,48E-83
ENSMUSG00000117575	1,298280358	1,79E-07	6,64E-07
ENSMUSG00000040483	1,297713727	2,12E-49	1,92E-47
ENSMUSG00000055296	1,297197846	2,93E-53	3,28E-51
ENSMUSG00000039470	1,296658039	6,11E-35	2,72E-33
ENSMUSG00000027932	1,294153669	4,58E-12	3,07E-11
ENSMUSG00000070709	1,29155586	9,22E-12	5,95E-11
ENSMUSG00000050855	1,287229905	9,72E-15	8,82E-14
ENSMUSG00000043993	1,286585769	3,73E-13	2,82E-12
ENSMUSG00000056498	1,285928335	9,82E-22	1,67E-20
ENSMUSG00000021611	1,285456605	1,55E-15	1,53E-14
ENSMUSG00000021400	1,28544579	5,63E-30	1,78E-28
ENSMUSG00000009207	1,284983531	9,39E-35	4,09E-33
ENSMUSG00000042708	1,284178151	3,84E-12	2,60E-11
ENSMUSG00000097908	1,283667862	3,95E-26	9,49E-25
ENSMUSG00000030142	1,283309456	1,83E-100	1,13E-97
ENSMUSG00000078247	1,281265764	9,18E-09	4,04E-08
ENSMUSG00000107331	1,280285499	3,98E-14	3,38E-13
ENSMUSG00000020439	1,279509917	5,08E-26	1,22E-24
ENSMUSG00000030166	1,279287631	3,46E-47	2,93E-45
ENSMUSG00000048307	1,277694339	4,00E-28	1,11E-26
ENSMUSG00000025277	1,275393972	1,80E-32	6,78E-31
ENSMUSG00000021675	1,274318091	2,41E-15	2,34E-14
ENSMUSG00000032553	1,272920564	1,32E-63	2,22E-61
ENSMUSG00000026285	1,272488831	3,06E-23	5,87E-22
ENSMUSG00000065738	1,268036425	1,78E-08	7,51E-08
ENSMUSG00000050786	1,26753345	5,04E-12	3,36E-11
ENSMUSG00000032596	1,266873793	2,49E-77	7,16E-75
ENSMUSG00000053460	1,265845291	1,36E-38	7,58E-37
ENSMUSG00000024308	1,262679187	1,45E-54	1,76E-52
ENSMUSG00000044701	1,261451049	3,89E-14	3,31E-13
ENSMUSG00000053205	1,260751766	2,03E-11	1,25E-10
ENSMUSG00000085385	1,258649853	6,55E-34	2,73E-32
ENSMUSG00000114230	1,257073204	8,00E-06	2,31E-05
ENSMUSG00000020592	1,255420054	2,12E-25	4,86E-24
ENSMUSG00000001588	1,25452355	2,26E-29	6,93E-28
ENSMUSG00000071337	1,251006998	1,90E-33	7,61E-32
ENSMUSG00000009995	1,250083285	7,39E-66	1,43E-63
ENSMUSG00000019809	1,249428264	8,57E-20	1,23E-18
ENSMUSG00000109179	1,249365478	1,79E-09	8,58E-09
ENSMUSG00000031167	1,248784456	8,68E-13	6,30E-12
ENSMUSG00000025498	1,248323224	3,93E-66	7,70E-64
ENSMUSG00000085396	1,248237684	2,44E-50	2,37E-48
ENSMUSG00000113425	1,247429751	5,27E-10	2,71E-09
ENSMUSG00000108312	1,246333113	4,62E-11	2,70E-10
ENSMUSG00000028587	1,244846197	6,37E-53	6,87E-51
ENSMUSG00000030091	1,243059993	3,55E-58	4,75E-56

ENSMUSG00000111601	1,24086737	9,65E-13	6,96E-12
ENSMUSG00000023393	1,240743732	5,82E-14	4,83E-13
ENSMUSG00000097680	1,239468456	7,94E-09	3,52E-08
ENSMUSG00000019710	1,237401372	4,19E-53	4,65E-51
ENSMUSG00000112096	1,235529222	1,70E-09	8,22E-09
ENSMUSG00000038717	1,233431376	4,80E-12	3,21E-11
ENSMUSG00000037243	1,230926615	5,26E-50	5,03E-48
ENSMUSG00000037894	1,230689657	1,29E-12	9,14E-12
ENSMUSG00000026047	1,23060382	1,18E-49	1,08E-47
ENSMUSG00000100280	1,230518522	5,80E-16	6,01E-15
ENSMUSG00000032204	1,22977787	1,63E-31	5,73E-30
ENSMUSG00000038963	1,228802362	1,39E-76	3,79E-74
ENSMUSG00000027428	1,224019671	1,11E-13	8,92E-13
ENSMUSG00000059901	1,223305992	9,88E-35	4,29E-33
ENSMUSG00000034863	1,221187199	3,99E-58	5,27E-56
ENSMUSG00000089726	1,220228489	3,19E-07	1,14E-06
ENSMUSG00000092274	1,218786524	9,55E-23	1,75E-21
ENSMUSG00000072893	1,216937689	1,57E-18	2,01E-17
ENSMUSG00000026104	1,214565947	1,58E-58	2,13E-56
ENSMUSG00000029104	1,213021655	9,96E-64	1,72E-61
ENSMUSG00000055633	1,212573687	8,18E-11	4,65E-10
ENSMUSG00000058470	1,211453573	3,88E-09	1,79E-08
ENSMUSG00000021556	1,2078917	3,22E-49	2,87E-47
ENSMUSG00000091021	1,206764537	6,23E-09	2,80E-08
ENSMUSG00000025574	1,202684966	5,04E-29	1,49E-27
ENSMUSG00000090215	1,202446779	1,86E-08	7,83E-08
ENSMUSG00000047789	1,201075452	3,71E-41	2,41E-39
ENSMUSG00000020841	1,200884379	2,04E-79	6,49E-77
ENSMUSG00000028293	1,20001054	1,89E-27	5,00E-26
ENSMUSG00000055632	1,199389758	1,01E-09	5,02E-09
ENSMUSG00000038822	1,199005185	1,61E-24	3,40E-23
ENSMUSG00000004565	1,198979524	2,40E-74	6,27E-72
ENSMUSG00000029328	1,198074519	5,75E-56	7,20E-54
ENSMUSG00000062867	1,194878313	1,46E-11	9,17E-11
ENSMUSG00000078919	1,194701323	1,54E-08	6,59E-08
ENSMUSG00000022994	1,193626312	1,74E-27	4,60E-26
ENSMUSG00000087574	1,192627937	2,96E-08	1,21E-07
ENSMUSG00000028068	1,192269115	9,43E-33	3,63E-31
ENSMUSG00000113192	1,191579675	3,28E-13	2,49E-12
ENSMUSG00000031149	1,191369624	1,39E-23	2,75E-22
ENSMUSG00000057411	1,191075079	8,37E-19	1,11E-17
ENSMUSG00000030410	1,190374711	3,71E-24	7,61E-23
ENSMUSG00000111317	1,188924225	6,82E-16	7,00E-15
ENSMUSG00000106943	1,187921414	1,39E-09	6,79E-09
ENSMUSG00000031736	1,186099088	2,45E-12	1,68E-11
ENSMUSG00000033809	1,185034434	7,84E-43	5,62E-41
ENSMUSG00000031533	1,182815436	1,61E-38	8,91E-37
ENSMUSG00000037989	1,182262235	2,19E-21	3,57E-20

ENSMUSG00000050954	1,178827754	4,64E-13	3,48E-12
ENSMUSG00000043460	1,178014764	2,82E-11	1,70E-10
ENSMUSG00000112023	1,177313388	9,22E-38	4,98E-36
ENSMUSG00000020102	1,176884521	1,13E-33	4,70E-32
ENSMUSG00000030613	1,175725091	1,04E-13	8,36E-13
ENSMUSG00000028403	1,172855221	3,28E-52	3,41E-50
ENSMUSG00000027006	1,170950437	2,24E-73	5,59E-71
ENSMUSG00000061613	1,169945777	9,09E-17	1,00E-15
ENSMUSG00000035236	1,169746325	9,40E-19	1,23E-17
ENSMUSG00000044201	1,169644318	6,49E-19	8,69E-18
ENSMUSG00000002602	1,166474212	1,72E-35	7,84E-34
ENSMUSG00000058600	1,164932141	5,96E-17	6,71E-16
ENSMUSG00000073434	1,164662463	3,53E-27	9,06E-26
ENSMUSG00000021033	1,164544974	1,04E-52	1,11E-50
ENSMUSG00000037321	1,163814739	2,30E-50	2,25E-48
ENSMUSG00000024347	1,162650981	5,22E-30	1,66E-28
ENSMUSG00000047250	1,161967459	2,09E-36	1,03E-34
ENSMUSG00000114995	1,159987751	9,85E-10	4,91E-09
ENSMUSG00000039704	1,159027658	1,52E-46	1,23E-44
ENSMUSG00000102976	1,158297329	2,42E-21	3,94E-20
ENSMUSG00000018398	1,15706298	1,17E-35	5,41E-34
ENSMUSG00000008668	1,156385849	6,22E-17	6,99E-16
ENSMUSG00000032373	1,154578643	5,09E-67	1,07E-64
ENSMUSG00000015937	1,154515987	1,15E-66	2,37E-64
ENSMUSG00000001128	1,153889465	1,02E-25	2,38E-24
ENSMUSG00000041220	1,153688856	2,91E-45	2,25E-43
ENSMUSG00000078784	1,152856782	2,04E-16	2,19E-15
ENSMUSG00000079111	1,151259782	2,14E-54	2,52E-52
ENSMUSG00000027245	1,151041513	2,67E-07	9,63E-07
ENSMUSG00000031951	1,146734691	7,18E-16	7,35E-15
ENSMUSG00000022479	1,145136347	6,84E-09	3,06E-08
ENSMUSG00000063286	1,14393751	1,64E-21	2,72E-20
ENSMUSG00000029283	1,143072151	5,78E-23	1,08E-21
ENSMUSG00000102302	1,142086079	1,60E-08	6,80E-08
ENSMUSG00000001138	1,139867061	4,04E-25	9,10E-24
ENSMUSG00000073489	1,138762161	3,34E-30	1,07E-28
ENSMUSG00000041841	1,138464027	2,09E-12	1,45E-11
ENSMUSG00000097194	1,138257204	2,69E-10	1,44E-09
ENSMUSG00000035242	1,137653728	1,18E-13	9,48E-13
ENSMUSG00000030647	1,137317454	2,87E-23	5,51E-22
ENSMUSG00000047414	1,136863781	3,55E-71	8,35E-69
ENSMUSG00000025050	1,135664976	1,36E-30	4,44E-29
ENSMUSG00000113035	1,131220568	4,28E-20	6,28E-19
ENSMUSG00000020638	1,130356538	3,73E-19	5,12E-18
ENSMUSG00000024299	1,128508678	9,59E-54	1,10E-51
ENSMUSG00000020142	1,127206475	1,95E-42	1,36E-40
ENSMUSG00000026605	1,12616114	1,88E-47	1,61E-45
ENSMUSG00000029602	1,124266441	3,26E-15	3,12E-14

ENSMUSG00000003526	1,120701203	1,69E-09	8,16E-09
ENSMUSG00000024059	1,119685673	3,35E-09	1,56E-08
ENSMUSG00000025473	1,119085304	3,21E-80	1,05E-77
ENSMUSG00000009731	1,118898238	1,13E-08	4,90E-08
ENSMUSG00000019944	1,116158631	1,69E-08	7,16E-08
ENSMUSG00000024403	1,11120059	6,02E-10	3,08E-09
ENSMUSG00000021697	1,10812382	1,03E-10	5,78E-10
ENSMUSG00000038759	1,107235951	6,23E-53	6,78E-51
ENSMUSG00000051705	1,106493501	2,58E-11	1,56E-10
ENSMUSG00000025816	1,10527499	8,52E-17	9,45E-16
ENSMUSG00000097061	1,10257263	3,39E-10	1,78E-09
ENSMUSG00000105940	1,101665181	2,51E-08	1,04E-07
ENSMUSG00000038453	1,101623975	1,43E-10	7,87E-10
ENSMUSG00000051984	1,101488896	1,48E-07	5,52E-07
ENSMUSG00000022338	1,09854183	8,77E-13	6,36E-12
ENSMUSG00000105677	1,098328018	7,64E-10	3,87E-09
ENSMUSG00000087502	1,097881583	6,20E-09	2,78E-08
ENSMUSG00000027641	1,09678393	2,88E-34	1,22E-32
ENSMUSG00000028979	1,094612261	2,66E-11	1,61E-10
ENSMUSG00000078651	1,093383783	5,49E-27	1,40E-25
ENSMUSG00000014551	1,088238242	1,74E-20	2,62E-19
ENSMUSG00000027360	1,087405954	3,78E-09	1,74E-08
ENSMUSG00000020788	1,085392062	2,20E-42	1,53E-40
ENSMUSG00000022587	1,084473837	5,93E-60	8,61E-58
ENSMUSG00000030386	1,083315832	2,21E-08	9,19E-08
ENSMUSG00000041064	1,082929774	1,01E-20	1,55E-19
ENSMUSG00000032306	1,082859728	1,44E-27	3,81E-26
ENSMUSG00000029672	1,082759732	2,61E-32	9,75E-31
ENSMUSG00000021243	1,081847503	7,53E-09	3,35E-08
ENSMUSG00000105272	1,080694267	4,32E-07	1,51E-06
ENSMUSG00000018566	1,080590423	1,01E-12	7,24E-12
ENSMUSG00000071866	1,080487091	3,64E-06	1,11E-05
ENSMUSG00000074480	1,080274458	1,43E-17	1,69E-16
ENSMUSG00000035458	1,080220475	2,72E-12	1,86E-11
ENSMUSG00000037239	1,079278097	2,06E-28	5,82E-27
ENSMUSG00000020407	1,078472636	1,16E-18	1,51E-17
ENSMUSG00000003847	1,078315219	1,14E-21	1,92E-20
ENSMUSG00000024666	1,077737123	3,04E-09	1,42E-08
ENSMUSG00000046798	1,077720986	5,24E-22	9,11E-21
ENSMUSG00000084796	1,077527792	6,51E-13	4,81E-12
ENSMUSG00000019818	1,076969734	3,18E-54	3,70E-52
ENSMUSG00000054715	1,075685205	7,34E-14	6,01E-13
ENSMUSG00000042155	1,075412532	4,15E-12	2,80E-11
ENSMUSG00000050043	1,075186575	2,60E-10	1,39E-09
ENSMUSG00000024085	1,074922167	1,32E-63	2,22E-61
ENSMUSG00000030207	1,074891971	3,69E-36	1,78E-34
ENSMUSG00000037434	1,074690306	2,22E-38	1,22E-36
ENSMUSG00000071537	1,074603219	5,33E-22	9,25E-21

ENSMUSG00000098234	1,07457207	1,27E-16	1,38E-15
ENSMUSG00000029836	1,072898269	5,13E-08	2,04E-07
ENSMUSG00000032420	1,072889714	3,51E-59	4,92E-57
ENSMUSG00000056290	1,072569023	5,05E-07	1,75E-06
ENSMUSG00000062328	1,072536206	1,09E-09	5,44E-09
ENSMUSG00000097042	1,072294261	1,05E-15	1,06E-14
ENSMUSG00000030869	1,072161866	1,77E-15	1,74E-14
ENSMUSG00000059939	1,071498989	3,54E-38	1,94E-36
ENSMUSG00000085687	1,070776065	1,07E-11	6,84E-11
ENSMUSG00000013155	1,069764951	6,77E-15	6,21E-14
ENSMUSG00000040840	1,069468019	2,28E-09	1,08E-08
ENSMUSG00000018574	1,068783421	2,14E-21	3,50E-20
ENSMUSG00000020844	1,06827797	1,99E-07	7,30E-07
ENSMUSG00000054469	1,06720287	6,67E-36	3,14E-34
ENSMUSG00000010608	1,067166254	1,64E-28	4,67E-27
ENSMUSG00000039254	1,066059968	1,23E-43	9,07E-42
ENSMUSG00000029490	1,065958667	3,40E-08	1,38E-07
ENSMUSG00000103527	1,06581195	2,80E-12	1,91E-11
ENSMUSG00000030780	1,06577358	1,80E-21	2,96E-20
ENSMUSG00000054387	1,065675922	6,58E-26	1,56E-24
ENSMUSG00000020105	1,065619009	2,64E-11	1,60E-10
ENSMUSG00000095123	1,065281866	0,002360259	0,004530635
ENSMUSG00000021701	1,06470123	6,12E-31	2,08E-29
ENSMUSG00000081605	1,062526304	4,91E-07	1,71E-06
ENSMUSG00000074415	1,061647746	9,74E-06	2,77E-05
ENSMUSG00000049971	1,061105008	2,58E-08	1,06E-07
ENSMUSG00000046295	1,060153076	1,73E-15	1,70E-14
ENSMUSG00000028613	1,058818676	1,30E-56	1,66E-54
ENSMUSG00000023088	1,058682833	9,04E-59	1,24E-56
ENSMUSG00000031004	1,056844239	1,21E-40	7,65E-39
ENSMUSG00000098090	1,0562211	1,65E-10	9,04E-10
ENSMUSG00000021103	1,056203015	1,99E-34	8,48E-33
ENSMUSG00000045205	1,054288657	7,25E-50	6,83E-48
ENSMUSG00000021831	1,053790552	5,60E-68	1,20E-65
ENSMUSG00000057329	1,052042651	1,90E-21	3,12E-20
ENSMUSG00000032661	1,051918799	5,64E-61	8,62E-59
ENSMUSG00000042814	1,051406883	7,32E-08	2,84E-07
ENSMUSG00000041845	1,048635168	2,27E-11	1,39E-10
ENSMUSG00000029419	1,04733317	1,75E-14	1,54E-13
ENSMUSG00000106383	1,047001759	4,30E-05	0,000110231
ENSMUSG00000035245	1,04686367	3,03E-20	4,51E-19
ENSMUSG00000034035	1,046247951	1,57E-11	9,84E-11
ENSMUSG00000029177	1,045306915	5,26E-22	9,13E-21
ENSMUSG00000104435	1,044037037	4,52E-11	2,64E-10
ENSMUSG00000030802	1,044031206	5,29E-42	3,55E-40
ENSMUSG00000038593	1,043080437	1,38E-26	3,43E-25
ENSMUSG00000031200	1,042827686	8,82E-11	4,99E-10
ENSMUSG00000048458	1,042501613	8,30E-10	4,19E-09

ENSMUSG00002076161	1,042394841	4,52E-06	1,36E-05
ENSMUSG00000032265	1,040712684	1,31E-14	1,17E-13
ENSMUSG00000030393	1,040552784	2,13E-10	1,15E-09
ENSMUSG00000027580	1,0389123	2,29E-51	2,37E-49
ENSMUSG00000042286	1,038246743	2,03E-18	2,58E-17
ENSMUSG00000038400	1,03758884	1,43E-06	4,66E-06
ENSMUSG00000022033	1,037231691	1,70E-11	1,06E-10
ENSMUSG00000034612	1,037123227	2,58E-18	3,23E-17
ENSMUSG00000073600	1,036615442	2,87E-17	3,31E-16
ENSMUSG00000028800	1,03612885	1,43E-06	4,63E-06
ENSMUSG00000047909	1,035927566	1,51E-21	2,52E-20
ENSMUSG00000080316	1,035533546	2,09E-08	8,74E-08
ENSMUSG00000015468	1,034571886	2,67E-20	3,99E-19
ENSMUSG00000060636	1,034501268	4,04E-12	2,73E-11
ENSMUSG00000030688	1,034101177	3,98E-08	1,60E-07
ENSMUSG00000037787	1,033717563	4,28E-14	3,63E-13
ENSMUSG00000046324	1,033328178	1,88E-52	1,98E-50
ENSMUSG00000043243	1,032367623	5,02E-15	4,68E-14
ENSMUSG00000017778	1,031454145	9,48E-09	4,16E-08
ENSMUSG00000039917	1,031437451	1,87E-32	7,02E-31
ENSMUSG00000021240	1,029553257	1,96E-54	2,33E-52
ENSMUSG00000060716	1,029084558	1,01E-16	1,11E-15
ENSMUSG00000100362	1,028180778	1,14E-10	6,38E-10
ENSMUSG00000108503	1,027352271	1,15E-06	3,79E-06
ENSMUSG00000024736	1,02512783	2,05E-19	2,88E-18
ENSMUSG00000073791	1,024237103	4,67E-15	4,37E-14
ENSMUSG00000024887	1,024205829	1,25E-25	2,91E-24
ENSMUSG00000045362	1,023599072	4,08E-55	5,05E-53
ENSMUSG00000074629	1,023327634	3,06E-06	9,48E-06
ENSMUSG00000026921	1,022509724	9,81E-12	6,30E-11
ENSMUSG00000090086	1,021589478	6,16E-06	1,82E-05
ENSMUSG00000097743	1,021256165	1,17E-06	3,86E-06
ENSMUSG00000098055	1,019454436	1,32E-22	2,39E-21
ENSMUSG00000017417	1,019293984	3,59E-28	9,95E-27
ENSMUSG00000032593	1,019095402	2,02E-07	7,41E-07
ENSMUSG00000057421	1,019002899	1,24E-26	3,12E-25
ENSMUSG00000028958	1,018920056	4,35E-11	2,55E-10
ENSMUSG00000027487	1,018876159	1,89E-11	1,17E-10
ENSMUSG00000099708	1,012297062	1,59E-06	5,12E-06
ENSMUSG00000021131	1,011668603	1,14E-08	4,96E-08
ENSMUSG00000056666	1,010403267	1,82E-52	1,93E-50
ENSMUSG00000035936	1,009852891	1,03E-12	7,37E-12
ENSMUSG00000073468	1,009655256	9,43E-18	1,13E-16
ENSMUSG00000032431	1,009402669	2,45E-28	6,88E-27
ENSMUSG00000020576	1,008586111	3,96E-44	2,97E-42
ENSMUSG00000097589	1,008018011	1,58E-08	6,72E-08
ENSMUSG00000002486	1,007978831	1,70E-12	1,19E-11
ENSMUSG00000018999	1,007120152	1,86E-42	1,30E-40

ENSMUSG00000009575	1,006537495	5,30E-37	2,72E-35
ENSMUSG00000029516	1,003997474	1,03E-36	5,21E-35
ENSMUSG00000035365	1,003281635	7,09E-19	9,44E-18
ENSMUSG00000039953	1,002451997	9,09E-47	7,43E-45
ENSMUSG00000108738	1,001647062	6,12E-05	0,000153194
ENSMUSG00000038930	1,00093845	4,57E-19	6,22E-18
ENSMUSG00000024982	1,000757804	7,23E-27	1,83E-25

Reprimidos

gene_id	logFC	PValue	FDR
ENSMUSG00000056008	-3,365404071	4,98E-53	5,48E-51
ENSMUSG00000055177	-3,03896782	3,10E-25	7,05E-24
ENSMUSG00000055148	-2,685588995	3,63E-87	1,64E-84
ENSMUSG00000028111	-2,361693373	7,31E-41	4,65E-39
ENSMUSG00000059956	-2,328967785	9,51E-22	1,62E-20
ENSMUSG00000054364	-2,253105312	4,62E-37	2,38E-35
ENSMUSG00000038173	-2,07542911	6,93E-22	1,19E-20
ENSMUSG00000073236	-1,970816689	6,09E-19	8,19E-18
ENSMUSG00000099583	-1,864349526	6,75E-18	8,21E-17
ENSMUSG00000111720	-1,832930368	1,17E-15	1,17E-14
ENSMUSG00000036086	-1,628975471	1,32E-104	9,16E-102
ENSMUSG00000096140	-1,615944438	5,63E-19	7,64E-18
ENSMUSG00000101225	-1,614104905	1,19E-24	2,55E-23
ENSMUSG00000024210	-1,601802866	6,48E-12	4,26E-11
ENSMUSG00002076074	-1,601479464	3,76E-19	5,15E-18
ENSMUSG00000108732	-1,584088014	1,61E-45	1,26E-43
ENSMUSG00000032289	-1,568920388	1,10E-23	2,20E-22
ENSMUSG00000047246	-1,562674361	3,43E-18	4,26E-17
ENSMUSG00000035783	-1,55170636	1,47E-17	1,73E-16
ENSMUSG00000027602	-1,524446046	2,44E-23	4,73E-22
ENSMUSG00000025207	-1,491951532	2,49E-56	3,15E-54
ENSMUSG00000059278	-1,473101867	5,30E-60	7,80E-58
ENSMUSG00000021376	-1,453255976	3,86E-14	3,29E-13
ENSMUSG00000050945	-1,4479153	2,14E-13	1,66E-12
ENSMUSG00000110231	-1,423785344	7,06E-63	1,14E-60
ENSMUSG00000022562	-1,422639101	1,09E-14	9,79E-14
ENSMUSG00000030672	-1,413589443	2,21E-17	2,56E-16
ENSMUSG00000031637	-1,410775587	6,12E-11	3,52E-10
ENSMUSG00000105509	-1,406046044	1,83E-11	1,13E-10
ENSMUSG00000086742	-1,386790321	6,26E-60	8,98E-58
ENSMUSG00000060639	-1,359937394	7,15E-13	5,25E-12
ENSMUSG00000022099	-1,347397897	6,84E-21	1,07E-19
ENSMUSG00000060509	-1,344613628	1,26E-13	1,01E-12

ENSMUSG00000055069	-1,344115648	1,21E-20	1,85E-19
ENSMUSG00000115007	-1,336416389	1,05E-10	5,89E-10
ENSMUSG00000085154	-1,331982119	8,51E-10	4,28E-09
ENSMUSG00000029699	-1,330648135	2,51E-09	1,18E-08
ENSMUSG00000063856	-1,315052844	3,26E-66	6,62E-64
ENSMUSG00000074622	-1,310217389	2,53E-11	1,54E-10
ENSMUSG00000025226	-1,307181407	7,51E-14	6,14E-13
ENSMUSG00000051682	-1,296916129	1,41E-24	2,99E-23
ENSMUSG00000042659	-1,290596538	9,87E-84	3,63E-81
ENSMUSG00000071656	-1,2696207	7,73E-11	4,41E-10
ENSMUSG00000064215	-1,264389614	1,90E-73	4,86E-71
ENSMUSG00000045326	-1,260187297	1,60E-09	7,78E-09
ENSMUSG00000078851	-1,231726935	3,93E-09	1,81E-08
ENSMUSG00000049848	-1,228967244	3,97E-18	4,91E-17
ENSMUSG00000104568	-1,228205919	1,27E-14	1,14E-13
ENSMUSG00000021338	-1,223819129	2,58E-41	1,69E-39
ENSMUSG00000020669	-1,211051851	2,02E-08	8,48E-08
ENSMUSG00000022766	-1,210863906	3,27E-09	1,52E-08
ENSMUSG00000031155	-1,207215509	2,22E-40	1,38E-38
ENSMUSG00000032340	-1,196936879	1,12E-24	2,41E-23
ENSMUSG00000100594	-1,175660169	1,23E-07	4,61E-07
ENSMUSG00000036181	-1,173864962	1,07E-26	2,69E-25
ENSMUSG00000022818	-1,171955374	5,14E-08	2,04E-07
ENSMUSG00000071637	-1,171724685	1,48E-22	2,67E-21
ENSMUSG00000018102	-1,168264845	1,07E-36	5,40E-35
ENSMUSG00000063851	-1,167972384	8,69E-31	2,90E-29
ENSMUSG00000033405	-1,165547928	6,64E-08	2,59E-07
ENSMUSG00000036526	-1,154559416	7,37E-15	6,75E-14
ENSMUSG00000059970	-1,146668815	6,04E-12	3,99E-11
ENSMUSG00000008384	-1,144686165	9,96E-32	3,61E-30
ENSMUSG00000032398	-1,138606471	4,83E-18	5,93E-17
ENSMUSG00000039195	-1,136959118	1,73E-26	4,27E-25
ENSMUSG00000075297	-1,129456872	1,02E-24	2,21E-23
ENSMUSG00000037217	-1,125778263	3,24E-24	6,67E-23
ENSMUSG00000097283	-1,122742084	6,65E-16	6,84E-15
ENSMUSG00000081975	-1,10992675	1,86E-13	1,46E-12
ENSMUSG00000019832	-1,105260417	3,78E-71	8,72E-69
ENSMUSG00000033739	-1,101984377	3,19E-51	3,26E-49
ENSMUSG00000068697	-1,094633707	2,46E-37	1,30E-35
ENSMUSG00000115584	-1,088791614	1,71E-06	5,47E-06
ENSMUSG00000059195	-1,08649156	1,07E-20	1,64E-19
ENSMUSG00000028756	-1,083464517	3,91E-40	2,36E-38
ENSMUSG00000019578	-1,073912422	5,07E-17	5,72E-16
ENSMUSG00000015337	-1,071746918	9,26E-09	4,07E-08
ENSMUSG00000094497	-1,071659998	2,87E-35	1,30E-33
ENSMUSG00000018923	-1,066804725	6,36E-36	3,00E-34
ENSMUSG00000050174	-1,065139346	2,04E-07	7,49E-07
ENSMUSG00000068957	-1,063911167	9,62E-11	5,41E-10

ENSMUSG00000039963	-1,060143776	2,13E-07	7,80E-07
ENSMUSG00000062825	-1,051371964	2,95E-26	7,13E-25
ENSMUSG00000031444	-1,049501635	7,18E-14	5,90E-13
ENSMUSG00000024787	-1,046278853	3,51E-29	1,06E-27
ENSMUSG00000042312	-1,040486998	6,89E-45	5,30E-43
ENSMUSG00000053560	-1,037998278	7,07E-35	3,12E-33
ENSMUSG00000115193	-1,034201047	1,24E-06	4,07E-06
ENSMUSG00000086756	-1,027148021	1,45E-06	4,70E-06
ENSMUSG00000049287	-1,027080395	4,45E-15	4,18E-14
ENSMUSG00000066553	-1,021567885	3,35E-39	1,92E-37
ENSMUSG00000038239	-1,01884237	2,69E-08	1,11E-07
ENSMUSG00000047821	-1,017499356	6,48E-19	8,69E-18
ENSMUSG00000079243	-1,010545483	1,71E-32	6,46E-31
ENSMUSG00000023048	-1,009867682	7,57E-50	7,07E-48
ENSMUSG00000049491	-1,006762488	1,39E-05	3,86E-05
ENSMUSG00000118377	-1,004543828	3,83E-10	2,01E-09
ENSMUSG00000054582	-1,003141506	3,09E-11	1,85E-10
