



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

PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE MACRÓFAGOS THP-1  
INFECTADOS POR *Corynebacterium pseudotuberculosis*

CARLOS LEONARDO DE ARAGÃO ARAÚJO

BELÉM – PARÁ

2022

CARLOS LEONARDO DE ARAGÃO ARAÚJO

PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE MACRÓFAGOS THP-1  
INFECTADOS POR *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Ribeiro Carneiro

BELÉM – PARÁ

2022

CARLOS LEONARDO DE ARAGÃO ARAÚJO

PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE MACRÓFAGOS THP-1  
INFECTADOS POR *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Data da apresentação: 18/08/2022

BANCA EXAMINADORA:

Dr<sup>a</sup>. Adriana Ribeiro Carneiro  
(UFPA – Orientadora e Presidente da Banca)

Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos  
(UFPA – Membro interno)

Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira  
(IEC – Membro interno)

Dr<sup>a</sup>. Edilene Oliveira da Silva  
(UFPA – Membro externo)

Dr<sup>a</sup>. Ana Cecília Ribeiro Cruz  
(IEC – Membro externo)

Dr. Fabiano Moreira  
(UFPA – Suplente)

<b>INSTITUIÇÕES</b>	
Universidade Federal do Pará (UFPA)	<p>Laboratório de Genômica e Bioinformática</p> <p>Laboratório de Biologia Estrutural</p> <p>Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações</p> <p>Instituto de Medicina Veterinária (Campus Castanhal)</p>
Instituto Evandro Chagas (IEC)	<p>Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM)</p> <p>Laboratório de Biologia Molecular (SAARB)</p>
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)	Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)	Laboratório de Genética Celular e Molecular
<b>AGÊNCIAS FINANCIADORAS</b>	
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)	
Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA)	

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)**

---

D278p de Aragão Araújo, Carlos Leonardo.  
Perfil da expressão gênica diferencial de macrófagos  
THP-1 infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* /  
Carlos Leonardo de Aragão Araújo. — 2022.  
121 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Ribeiro Carneiro  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. Infecção in vitro. 2. *Corynebacterium*  
*pseudotuberculosis*. 3. Células THP-1. 4. RNA-Seq. I.  
Título.

CDD 574.88

---

*O que faremos com o que aprendemos em cada esquina da vida é problema nosso. E talvez seja a solução. A vida fica muito maior quando estamos atentos e abertos ao aprendizado nos pequenos detalhes, quando nos livramos da prepotência das verdades absolutas. Às vezes a escolha é muito simples: a flexibilidade das folhas ao vento ou a rigidez cadavérica das grandes certezas.*

Humberto Gessinger

## AGRADECIMENTOS

Acredito que absolutamente nada do que conquistei até hoje tenha sido isento da influência de meus pais e irmãos. Tudo o que sou, tudo o que faço é por eles. Dona Sandra, obrigado por toda dedicação, todo esforço, toda coragem e toda a garra. Você me inspira ser um homem melhor todo dia. Seu Carlos Augusto (*in memoriam*), obrigado pelo incentivo, pelo investimento na minha educação, e principalmente por toda força que tu demonstrou enquanto estava aqui conosco. Foi por pouco que você não pôde presenciar a conclusão de mais essa etapa, mas espero que aí de cima você esteja orgulhoso do teu filho. A vocês quatro, os amo infinitamente. Obrigado por todo amor hoje e sempre.

A Adriana, pela parceria. Aprendi muito estando no seu grupo. Obrigado pela orientação, pela receptividade e pelas trocas. Esses quase 7 anos foram essenciais para a formação do profissional que sou hoje. Também agradeço a todos os alunos que passaram pela equipe ao longo de todo esse tempo. Tenho guardado com grande carinho a convivência diária com vocês.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Genômica e Bionformática. Tive a oportunidade de trabalhar e conviver com profissionais incríveis – apoio, técnicos, professores-pesquisadores e estudantes – que compartilharam comigo as diferentes nuances de fazer ciência no Brasil. À professora Paula e professor Artur, em especial, muito obrigado por terem aberto as portas do CGBS.

Preciso agradecer aos meus grandes parceiros nessa jornada. Alyne, Carla, Cassia, Giulia, Hugo, Pablo, Patrícia e Vitória. Compartilhar a vida com pessoas tão incríveis é uma das melhores coisas que levo comigo. Jory e Larissa, nem que eu vivesse mil anos conseguiria agradecer o suficiente o apoio, o carinho e a dedicação de vocês. Meus amigos, vocês são minha inspiração diária. Ver o nosso ponto de partida e onde estamos hoje me enche de orgulho. Amo cada um de vocês.

“*Funny how sometimes you just find things*”. Emerson, o que temos criado fala por si só. Isso prova que as coisas acontecem realmente na hora certa, e que bom que no meio de tantas situações tivemos a oportunidade de nos (re)conhecermos. Agradeço pelo amor, paciência, empatia e atenção nessa fase final. Que possamos compartilhar essa e muitas outras conquistas daqui pra frente, te amo.

Este trabalho é fruto de uma colaboração inter-institucional. Nada do que foi alcançado seria possível sem a ajuda dos professores Rommel, Edivaldo, Edilene, Ana Cecília, Vasco e seus respectivos grupos de pesquisa. Obrigado pelo acolhimento e pelas contribuições na tese.

Obrigado ao PPGBM, FAPESPA, CAPES e a UFPA, instituição que tenho tanto orgulho de fazer parte desde 2009, por todas as oportunidades.

A Deus, sempre ele, minha maior fonte de força, pelo dom da vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	13
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	14
<b>RESUMO</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1. Interação patógeno-hospedeiro.....	17
1.2. Gênero <i>Corynebacterium</i> .....	19
1.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	21
1.3.1. Patologias relacionadas.....	23
1.3.2. Epidemiologia.....	27
1.3.3. Imunopatogênese.....	28
1.3.4. Diagnóstico.....	32
1.3.5. Terapia.....	33
1.4. Sistema mononuclear fagocitário.....	35
1.5. Células THP-1.....	37
1.6. Ciências Genômicas.....	40
1.6.1. RNA-seq.....	43
1.6.2. Impacto das Ciências Genômicas no estudo de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	45
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	49
2.1. Objetivo Geral.....	49
2.2. Objetivos Específicos.....	49
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
3.1. Obtenção do material biológico.....	50
3.2. Cultivo bacteriano.....	50
3.3. Avaliação de aspectos microbiológicos.....	51
3.4. Identificação molecular da espécie.....	51
3.5. Análise proteômica.....	52
3.6. Curva de crescimento de bacteriano.....	52
3.7. Sequenciamento do genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	53
3.8. Montagem e anotação do genoma.....	54
3.9. Cultivo e diferenciação de THP-1.....	54



3.10. Infecção <i>in vitro</i> .....	55
3.11. Preparação da biblioteca e sequenciamento de RNA.....	55
3.12. Análise dos dados de transcriptoma .....	56
3.13. Análise de enriquecimento funcional.....	57
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
4.1. Prospecção e identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	58
4.2. Genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09 .....	60
4.3. Curva de crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09 .....	63
4.4. Diferenciação de THP-1 e infecção <i>in vitro</i> .....	65
4.5. Processamento dos dados de transcriptoma .....	67
4.6. Análise do perfil de expressão gênica.....	68
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>8. APÊNDICE</b> .....	<b>106</b>
Apêndice 1: Certificado de aceite do projeto de pesquisa pelo CEUA (UFPA) .....	106
Apêndice 2: Modelo do TCLE .....	107
Apêndice 3: Resultados de identificação da espécie pelo MALDI Biotyper	110
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>113</b>
Anexo 1: Artigos publicados em periódicos .....	113
Anexo 2: Capítulos de livro publicados .....	117
Anexo 3: Resumos publicados em anais de congressos.....	119

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACT	Ágar chocolate suplementado com telurito de potássio
AgNP	Nanopartículas de prata
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
cDNA	DNA complementar
CDS	Sequência codificante
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLR	<i>C-type lectin receptors</i>
Cp	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
CTR	Condição controle
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DMSO	Sulfóxido de dimetila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
INF	Condição infectado
LC	Linfadenite caseosa
LGB	Laboratório de Genômica e Bioinformática
logFC	<i>Log2 fold change</i>
LU	Linfangite ulcerativa

MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo
MDS	Escalonamento multidimensional
MED	Densidade de epítomos maduros
MHC-II	Complexos principais de histocompatibilidade de classe II
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
MRT	Macrófagos residentes em tecidos
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NK	Célula <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
ORF	Região aberta para leitura
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
pb	Pares de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
pg	Picograma
PLD	Fosfolipase D
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
psV	Plasmídeo de virulência associado ao serovar
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rPLD	PLD recombinante
rRNA	RNA ribossomal
SFB	Soro fetal bovino

SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SMRT	<i>Single Molecule, Real-Time</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TD	Toxina diftérica
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TPA	12-otetradecanolforbol-13-acetato
UFC	Unidade formadora de colônia
VR	Vacinologia reversa
WGS	<i>Whole Genome Shotgun</i>
μL	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítios de infecção inicial de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	23
Figura 2. Lesões características de LC em suas formas (A) superficial e (B) visceral. ....	24
Figura 3. Processo de fagocitose entre <i>C. pseudotuberculosis</i> e macrófago...	31
Figura 4. Cultivo de (A) monócitos e (B) macrófagos diferenciados.....	38
Figura 5. Representação do uso de análises de expressão gênica de macrófagos infectados <i>in vitro</i> por uso de RNA-seq. ....	44
Figura 6. Abscesso localizado em linfonodo submandibular de um carneiro com suspeita clínica de LC. ....	58
Figura 7. Placas de cultivo de <i>C. pseudotuberculosis</i> em (A) ágar sangue de carneiro e (B) ágar BHI. ....	58
Figura 8. Análise morfotintorial por <i>C. pseudotuberculosis</i> , visualizada em microscópio óptico em aumento de 100x. ....	59
Figura 9. Visualização do gel de agarose dos produtos da PCR quadruplex das cepas OI1 e OI3. ....	59
Figura 10. Análise de qualidade do genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09 gerados (A e B - R1 e R2, respectivamente) no sequenciamento e (C e D - R1 e R2, respectivamente) após a aplicação do filtro de qualidade. ....	61
Figura 11. Mapa genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09.....	63
Figura 12. Curva de crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09. ....	64
Figura 13. Micrografia de microscópio óptico invertido em lente de aumento de 30x das células THP-1 como (A) monócitos não diferenciados e (B) macrófagos diferenciados após o tratamento com PMA.....	65
Figura 14. Análise do controle de qualidade do RNA através de eletroforese automatizada.....	66
Figura 15. Análise de qualidade das leituras do sequenciamento de THP-1 perante a infecção <i>in vitro</i> antes (A e B) e após (C e D) o filtro de qualidade. .	67
Figura 16. Análise de controle de qualidade das leituras do sequenciamento de THP-1 na condição controle antes (A e B) e após (C e D) o filtro de qualidade. ....	68
Figura 17. Gráfico MDS apontando as diferenças entre as amostras dos grupos experimentais. ....	69
Figura 18. Gráfico de distribuição dos genes diferencialmente expressos. Os genes induzidos são representados em vermelho e os reprimidos em azul. ...	70
Figura 19. Análise funcional dos alvos com maiores e menores valores de expressão diferencial. ....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de primers utilizados na PCR quadruplex.....	52
Tabela 2. Resultado da montagem do genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> PA09 pelos programas SPAdes e Velvet.....	62
Tabela 3. Densidade de células bacterianas por tempo de cultivo.....	64
Tabela 4. Índices de qualidade da extração de RNA total.....	66
Tabela 5. Lista dos genes induzidos com maiores valores de logFC.....	71
Tabela 6. Lista dos genes reprimidos com menores valores de logFC.....	72

## RESUMO

A dinâmica de interação entre patógeno e hospedeiro no decorrer do processo infeccioso é responsável por uma complexa cascata de eventos celulares que envolvem a expressão de genes para a ativação de vias modulatórias em ambos os organismos. *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva, intracelular facultativa e agente etiológico de patologias que afetam uma vasta gama de hospedeiros, dentre elas a linfadenite caseosa. Este patógeno é capaz de subverter a resposta imunológica do indivíduo infectado, se instala no interior de macrófagos e pode migrar para diferentes tecidos causando infecções sistêmicas. Devido ao avanço nas tecnologias de sequenciamento e bioinformática, é possível monitorar a expressão de genes do hospedeiro, o que pode fornecer percepções acerca dos eventos envolvidos na interação e traçar estratégias para novas terapias contra doenças infecciosas. Desta forma, este trabalho se propôs a avaliar o perfil de expressão gênica de macrófagos humanos derivados da linhagem monocítica THP-1 perante a infecção *in vitro* por *C. pseudotuberculosis* PA09. A cepa bacteriana foi obtida a partir de material caseoso, identificada por métodos moleculares e seu genoma foi sequenciado pela plataforma MiSeq. Os monócitos THP-1 foram cultivados e diferenciados por meio de PMA a 100 ng/mL, seguido da infecção em MOI 1:5. O sequenciamento do transcriptoma dos macrófagos ocorreu na plataforma NextSeq e a análise *in silico* dos transcritos contra o genoma de referência GRCh38 envolveu um *workflow* dos programas Trimmomatic, HISAT2 e StringTie. O edgeR foi adotado para a determinação da expressão diferencial e a plataforma g:Profiler compilou os dados funcionais destes genes. No total, 1213 genes foram hiper-regulados e 1679 foram hipo-regulados, dos quais baseados na análise de enriquecimento, vários deles tem funções relacionadas a mecanismos do sistema imune. Dentre os genes induzidos destacam-se IDO1, CLEC4D, CCL8, IL-6, IL-7 e IL-12, ao passo que IL-4, SOD3 e catepsinas mostraram ser negativamente reguladas pelo patógeno. Este estudo abre possibilidade para investigações mais detalhadas sobre a modulação das respostas iniciais de *C. pseudotuberculosis* em seus diversos hospedeiros.

Palavras-chave: Infecção *in vitro*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, células THP-1, RNA-seq.

## ABSTRACT

The dynamics of interaction between pathogen and host during the infectious process is responsible for a complex cascade of cellular events that involve the expression of genes for the activation of modulatory pathways in both organisms. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive, facultative intracellular bacterium and the etiologic agent of pathologies that affect a wide range of hosts, including caseous lymphadenitis. This pathogen is able to subvert the immune response of the infected individual, settles inside macrophages and can migrate to different tissues causing systemic infections. Due to advances in sequencing technologies and bioinformatics, it is possible to monitor the expression of host genes, which can provide insights into the events involved in the interaction and devise strategies for new therapies against infectious diseases. Thus, this work aimed to evaluate the gene expression profile of human macrophages derived from the THP-1 monocytic cell line against *in vitro* infection caused by *C. pseudotuberculosis* PA09. The bacterial strain was obtained from caseous material, identified by molecular methods and its genome was sequenced using the MiSeq platform. THP-1 monocytes were cultured and differentiated by PMA at 100 ng/mL, followed by infection at MOI 1:5. Macrophage transcriptome sequencing was performed on NextSeq platform. The *in silico* analysis for the identification of transcripts against the GRCh38 reference genome, involved a workflow of the Trimmomatic, HISAT2 and StringTie software. The edgeR was adopted for the determination of differential expression and the g:Profiler platform compiled the functional data of these genes. In total, 1213 genes were up-regulated and 1679 were down-regulated, of which based on enrichment analysis, several of them have functions related to immune system mechanisms. Among the induced genes, IDO1, CLEC4D, CCL8, IL-6, IL-7 and IL-12 stand out, while IL-4, SOD3 and cathepsins were negatively regulated by the pathogen. This study opens the possibility for more detailed investigations on the modulation of the initial responses of *C. pseudotuberculosis* in its different hosts.

Keywords: *In vitro* infection, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, THP-1 cells, RNA-seq.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Interação patógeno-hospedeiro

A capacidade de virulência de agentes infecciosos está intimamente relacionada com as interações que ocorrem entre eles e seus hospedeiros durante a infecção, de forma que o dano causado a estes hospedeiros é o resultado conjunto de vários fatores, inclusive a modulação da expressão de genes codificantes dos componentes patogênicos de um e da resposta imunológica do outro (Casadevall & Pirofski, 2001).

Quando os patógenos entram em contato com seus hospedeiros, se deparam com as primeiras barreiras de proteção, como pele, muco, epitélio ciliado, bile e ácido gástrico. Ao conseguirem se aderir nestes sítios, as respostas imunes inatas não específicas são ativadas, por intermédio do recrutamento de peptídeos antimicrobianos, interferons, neutrófilos, células dendríticas, *natural killer* (NK) e macrófagos, os quais executam mecanismos rápidos com o objetivo de controlar a disseminação de agentes infecciosos (Murray et al. 2013).

Os macrófagos têm por função primordial realizar a captura e digestão de detritos celulares, agentes exógenos, células neoplásicas e microrganismos através da fagocitose. Além disto, também agem como uma ponte entre imunidade inata e adaptativa, exibindo antígenos para os linfócitos T, de modo a iniciar uma resposta celular específica contra o organismo invasor. Dada a importância do complexo monocítico-macrofágico para o sistema imunológico, diversas linhagens têm sido utilizadas como modelos para estudos da interação entre patógenos e hospedeiros (Aderem & Underhill 1999; Nau et al. 2002).

Agentes infecciosos bacterianos dispõem de estratégias para a persistência da infecção, possuindo elegantes e distintos mecanismos moleculares para se fixar e invadir seu hospedeiro. Uma grande variedade de bactérias comensais, patogênicas e patogênicas oportunistas interagem com seus hospedeiros através de adesinas, proteínas de superfície com função adesiva que promovem interações com receptores presentes na superfície das células eucarióticas (Schweppe et al. 2015).

Por ser um mecanismo básico para a patogenicidade, a adesão bacteriana estimula a ativação de macrófagos e a fagocitose, o que por vezes proporciona a eliminação dos microrganismos. Muitas bactérias patogênicas contornam estes transtornos através de uma camada superficial que impede o reconhecimento imunológico ou a fagocitose, expressando suas adesinas em estruturas poliméricas que se estendem para fora da superfície celular, permitindo interações iniciais do hospedeiro a uma distância segura (Kline et al. 2009).

Os pili, também denominados de fímbrias, são estruturas semelhantes a cabelos que se projetam na superfície bacteriana, podendo realizar o mecanismo contração por força, o que fornece às bactérias ferramentas para potencializar seu contato com as superfícies-alvo (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006).

Este mecanismo foi primeiramente caracterizado em bactérias Gram-negativas, especialmente *Escherichia coli*, porém diversos estudos apontam que patógenos Gram-positivos também fazem uso das fímbrias para adesão ao hospedeiro. Em *Corynebacterium diphtheriae*, por exemplo, o pilus é composto pelas subunidades SpA, SpaD e SpaH, além das pilinas SpaB e SpaC, que são montados covalentemente pela ação de sortases, que reconhecem o motivo LPXTG e o ligam ao peptidoglicano da parede celular (Ton-That & Schneewind, 2003). Em *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma espécie relacionada, a presença de genes ortólogos envolvidos na síntese das fímbrias parece ser um indicativo da utilização de um mecanismo semelhante ao de *C. diphtheriae* (Ott 2018).

Além da adesão, a capacidade de invadir células hospedeiras é outra característica essencial para os patógenos, visto que para diversos microrganismos o ambiente intracelular é determinante para seu crescimento. De maneira geral, as bactérias podem ser intracelulares facultativas ou obrigatórias, dependendo da necessidade de crescimento (Reece & Kaufmann, 2012).

No momento do contato entre os microrganismos e seus hospedeiros, os receptores *Toll-like* (TLR), proteínas transmembrana presentes em diversas células sentinela, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). A partir destes eventos, a imunidade inata é ativada a partir da associação TLR-PAMP, sendo responsáveis ainda pelo início da cascata de resposta imune adquirida contra os antígenos específicos (Albiger et al., 2007; Kawai & Akira, 2010). Quando as duas primeiras linhas de proteção se mostram insuficientes para eliminar a infecção, as respostas imunes adaptativas, por meio de anticorpos e células T, se dirigem para tentar contornar a invasão (Murray et al., 2013).

## 1.2. Gênero *Corynebacterium*

Este gênero pertence ao filo Actinobacteria e agrega bacilos Gram-positivos capazes de colonizar uma ampla variedade de nichos, como a microbiota normal da pele e das mucosas de diversos hospedeiros, assim como podem estar presentes no ambiente. *Corynebacterium* spp. foi proposto no final do século XIX para agregar o patógeno *C. diphtheriae* (Funke & Bernard 2011) e atualmente conta com 211 espécies, onde *C. uberis* e *C. poyangense* foram as mais recentemente incluídas, classificadas taxonomicamente em julho de 2022 (Kittl et al. 2022; Liu et al. 2022).

As corinebactérias são catalase positivo e oxidase e colagenase negativo, apresentam o conteúdo G+C do genoma que varia entre 47 a 74% e a membrana plasmática é coberta por uma camada de peptidoglicano que está ligada covalentemente a arabinogalactano, uma malha adicional de heteropolissacarídeo. Nesta estrutura complexa também existe uma camada externa de ácidos micólicos que funcionalmente são equivalentes à membrana externa das bactérias Gram-negativas (Dorella et al., 2006; Burkovski, 2013).

Uma das espécies mais conhecidas e estudadas é *C. glutamicum*, um organismo GRAS (Geralmente reconhecido como seguro, do inglês *Generally recognized as safe*) que tem grande apelo industrial por conta de sua capacidade de produzir aminoácidos utilizados como promotores de sabor e aditivos alimentares, sendo um dos principais microrganismos aplicados na biotecnologia branca (Lee et al. 2016). *C. variabile* é outro importante membro não-patogênico da espécie, também utilizado na indústria de alimentos, por ser residente da superfície de queijos contribuindo para o desenvolvimento de propriedades texturais e de sabor do produto (Schröder et al. 2011).

As espécies reconhecidamente patogênicas ou patogênicas oportunistas são classificadas em dois subgrupos: diftéricas e não-diftéricas. Esta divisão está baseada na capacidade que as bactérias têm de produzir a toxina diftérica (TD), codificada pelo gene viral *tox*, presente no DNA de corinefagos- $\beta$  (Oliveira et al. 2017).

Algumas bactérias não-diftéricas como *C. urealyticum* e *C. jeikeium*, são residentes da microbiota normal da pele que têm sido frequentemente associadas a infecções urinárias e nosocomiais, respectivamente, em pacientes imunocomprometidos. É importante ressaltar que apesar de não serem normalmente associados a infecções graves, isolados clínicos destas espécies apresentaram resistência a diversos antibióticos, o que indica pressão seletiva destas espécies em ambientes hospitalares (Hansmeier et al., 2007; Tauch et al., 2008; Samuel et al., 2019).

As corinebactérias difteróides são as mais conhecidas dentre as espécies patogênicas devido ao potencial letal da TD nos indivíduos infectados. *C. diphtheriae* é o agente causador da difteria, uma doença de evolução aguda e transmissível com manifestações locais e sistêmicas acometendo o trato respiratório superior que foi associada como uma das principais causas de morte infantil em diferentes continentes (Mattos-Guaraldi et al. 2001).

*C. ulcerans* é um patógeno emergente, que vem ganhando considerável atenção por agregar em seu genoma dois potentes fatores de virulência: a TD e a fosfolipase D (PLD). Esta bactéria é o agente etiológico de diversas infecções em animais, os quais podem ser transmitidos para humanos, causando a difteria de natureza zoonótica (Dias et al. 2011; Subedi et al. 2018).

Apesar de não ser imediatamente relacionada à difteria, algumas estirpes de *C. pseudotuberculosis* já foram reportadas como produtoras da TD em búfalos (Selim et al. 2016). Esta bactéria, entretanto, apresenta outros fatores de virulência – especialmente a PLD – que são capazes de causar infecção em diferentes espécies animais. O patógeno já foi reportado em vários países, inclusive no Brasil, e sem uma forma de combate completamente eficaz, soma prejuízos ao agronegócio mundial (Ruiz et al. 2011).

### 1.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A espécie tem sido descrita desde meados do século XIX, e é predominantemente conhecida por ser o agente etiológico de doenças que atingem uma ampla variedade de hospedeiros, dentre as quais se destaca a linfadenite caseosa (LC). *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa que é imóvel, não esporula e não possui cápsula. Seu tamanho pode variar de 0,6 a 1,0  $\mu\text{m}$  por 1,0 a 3,0  $\mu\text{m}$ . É um microrganismo pleomórfico em lesões naturais, e em cultivo tem forma de cocobacilo (Chirino-Zárraga et al. 2006; Dorella et al. 2006).

No que diz respeito ao cultivo, esta bactéria é anaeróbica facultativa e mesófila, possuindo condições ótimas de crescimento em uma temperatura de aproximadamente 37°C e pH 7,0 a 7,2 (Chirino-Zárraga et al., 2006). Quando inoculada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) líquido, é possível observar a formação de depósitos granulares com uma película na superfície. Em BHI semi-sólido, apresenta um crescimento inicialmente espaçado na superfície, onde posteriormente mostra uma organização em colônias opacas de crescimento concêntrico e de tom creme (Dorella et al., 2006a). Além disto, por se tratar de uma espécie  $\beta$ -hemolítica, as colônias em meio ágar sangue apresentam um tom branco amarelado de superfície fosca e um padrão de hemólise total, identificado pelos halos claros em torno das colônias (Funke & Bernard, 2011).

No que confere aos seus aspectos bioquímicos, *C. pseudotuberculosis* é oxidase negativo e catalase, urease e fosfolipase D positivo. As cepas são capazes de produzir ácido a partir de um amplo espectro de carboidratos, dentre eles, glicose, maltose, frutose, manose e galactose. Entretanto, é importante ressaltar sua incapacidade de metabolizar outros açúcares como xilose, lactose e rafinose. Polissacarídeos como arabinose, sacarose, dextrina e trealose, podem ou não ser reduzidos dependendo da estirpe (Dorella et al., 2006; Funke & Bernard, 2011).

A capacidade de reduzir nitrato a nitrito também é uma característica bioquímica que varia entre isolados da espécie, e foi justamente com base neste aspecto que Bibersten e colaboradores (1971) estabeleceram a classificação das estirpes de *C. pseudotuberculosis* em dois biovars: *ovis* (tipo I), nitrato-redutase negativo e *equi* (tipo II), nitrato-redutase positivo (Barakat et al. 1984).

### 1.3.1. Patologias relacionadas

No Brasil, a LC é popularmente conhecida como “mal do caroço”, e consiste em uma patologia infectocontagiosa crônica de ocorrência global que acomete pequenos ruminantes, ocasionando a formação de abscessos em nódulos linfáticos que apresentam material purulento de coloração branco-esverdeada. Este agravo pode se manifestar em duas formas clínicas que podem ou não ocorrer simultaneamente no mesmo hospedeiro. A LC superficial é a forma mais disseminada, onde ocorre a formação dos abscessos palpáveis característicos da doença. Em via de regra, todos os linfonodos do indivíduo podem servir de ponto de fixação para a bactéria dependendo da via de entrada, contudo, é comum que os sítios preferenciais do patógeno sejam os linfonodos parotídeos, retrofaríngeos, submandibulares, pré-femorais e poplíteos (Baird & Fontaine, 2007).

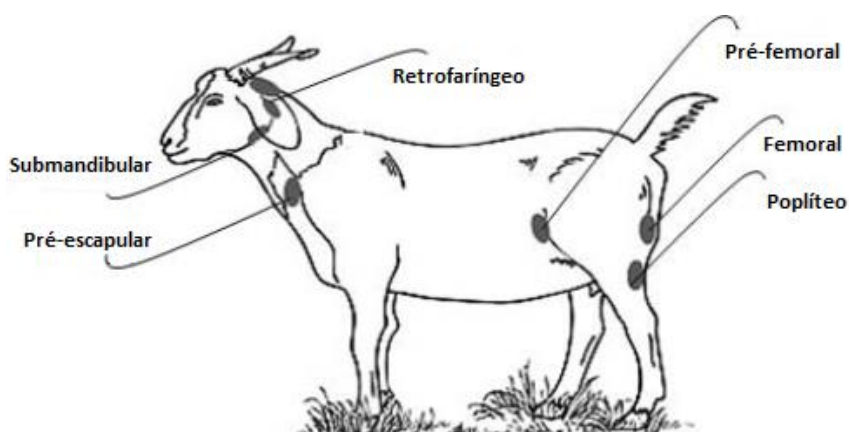


Figura 1. Sítios de infecção inicial de *C. pseudotuberculosis*.  
Fonte: Osman et al., 2018, adaptado.

Em seu quadro clínico mais grave, a LC visceral, *C. pseudotuberculosis* atinge órgãos internos como pulmões, fígado e rins, causando a condenação de carcaça e couro. Neste estágio, devido ao avançado grau de debilidade, normalmente os animais são eutanasiados (Ellis et al., 1987; Williamson, 2001; Al-Gaabary et al., 2009; Ferrer et al., 2009).

A progressão da doença ocorre principalmente quando a bactéria entra em contato com o hospedeiro, migra diretamente para um linfonodo e causa a formação de múltiplos piogranulomas que se desenvolvem até dar origem aos abscessos caseosos, que vão sendo primeiro circundados por células epiteliais e posteriormente por uma camada de tecido conjuntivo fibroso. A repetição deste padrão resulta no nódulo maduro formado por uma massa esférica em lâminas, com aspecto de cebola (Figura 2).

A forma clínica visceral ocorre quando *C. pseudotuberculosis* consegue atingir a corrente sanguínea ou o sistema linfático, migrando e posteriormente lesionando outros órgãos (Williamson, 2001; Ferrer et al., 2009).

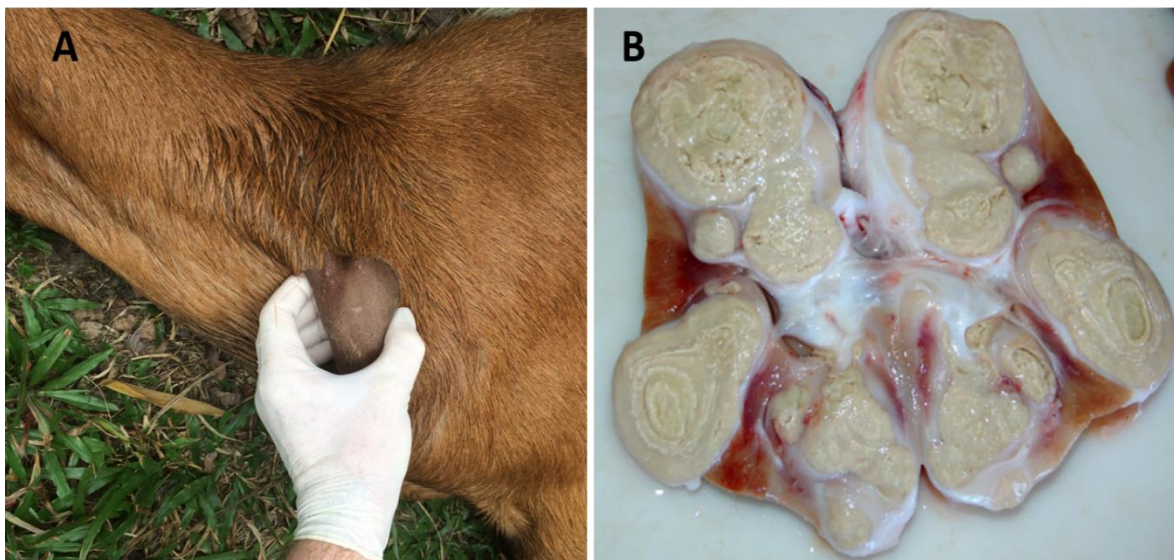


Figura 2. Lesões características de LC em suas formas (A) superficial e (B) visceral.  
Fonte: (A) autor, (B) Ferrer et al., 2009, adaptado.

A LC é considerada uma patologia crônica por conta de seu desenvolvimento lento, podendo também ser recorrente ao longo da vida de seu hospedeiro mesmo quando os linfonodos acometidos são extirpados, já que bactérias viáveis podem ser isoladas muito tempo após o contato inicial, causando um novo ciclo infeccioso mesmo depois de um período de quiescência (Williamson, 2001; Fontaine & Baird, 2008).



Animais infectados podem disseminar a bactéria pelo solo, alimentação, água e instalações, através de secreções dos abscessos que supuram espontaneamente. Desta forma, injúrias causadas por cortes em gravetos secos e tosquia mal executada podem atuar como porta de entrada para a instalação do patógeno através do contato direto ou indireto com o pus dos abscessos dos animais doentes, propagando a bactéria por todo o rebanho (Ellis et al. 1987; Spier et al. 2012).

*C. pseudotuberculosis* também é a responsável por causar a linfangite ulcerativa (LU), uma patologia que provoca lesões no pescoço, flancos e membros distais de equinos e bovinos. Nesta doença, a bactéria migra pelos vasos linfáticos e causa o desenvolvimento de abscessos semelhantes aos de LC, que se desenvolvem em feridas e causam inchaço na região afetada, interferindo na circulação arterial dos membros (Singathia et al. 2011).

Os abscessos podem supurar e expelirem uma secreção esverdeada, resultando em úlceras com bordas irregulares e uma base necrótica. Além disto, os animais acometidos pela LU também podem apresentar quadros de letargia e anorexia (Steinman et al. 1999; Zavošti et al. 2009).

Estirpes pertencentes a ambos os biovars de *C. pseudotuberculosis* têm a capacidade de infectar bovinos, e nestes hospedeiros a bactéria pode causar infecções cutâneas e viscerais, além de mastite em gado leiteiro (Yeruham et al. 1996). A mastite é uma das doenças mais graves em fêmeas leiteiras por conta das perdas financeiras devido a diminuição da quantidade de leite e consequentemente seus derivados, além de ser principal causa de abate por razões sanitárias (Nabih et al. 2018).

Apesar de ser um patógeno conhecido majoritariamente por sua importância veterinária, relatos na literatura já foram feitos no que se refere à infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos. O quadro de linfadenite humana em dez pacientes foi confirmado por meio de análises microbiológicas, bioquímicas, histopatológicas e moleculares. Neste relato de caso, todos os indivíduos infectados entraram em contato ou ingeriram carne de ovelhas acometidas com LC, levando a crer que a propagação do patógeno se deu através de causas ocupacionais e ingestão de carne de cordeiro contaminada (Peel et al. 1997).

A reincidência da doença em humanos também foi reportada em um paciente que havia trabalhado com um rebanho de ovinos, devido ao aparecimento de um abscesso caseoso localizado no braço. O material foi drenado e as análises de identificação foram positivas para *C. pseudotuberculosis*. Após a terapia com antibióticos a lesão cicatrizou, porém três meses após o ocorrido, o indivíduo deu entrada novamente no hospital em virtude de uma dor intensa no mesmo braço com eritema ao redor da cicatriz e um grande nódulo axilar flutuante, e após uma nova bateria de exames, foi constatada a presença da mesma bactéria (Bregenzer et al. 1997).

Por conta da baixa prevalência de registros de casos e subnotificação, não existem kits comerciais disponíveis para o diagnóstico de linfadenite em humanos. Recentemente, um estudo descreveu a sororreatividade a antígenos secretados por *C. pseudotuberculosis* em indivíduos que lidam diretamente com o patógeno. Os ensaios de *Western blot* detectaram 100% de reatividade em trabalhadores rurais e cerca de 87% em profissionais que tem contato com a bactéria em laboratório, reforçando a necessidade de medidas de biossegurança eficazes para evitar a contaminação (Santos et al. 2022).

### 1.3.2. Epidemiologia

Esta bactéria possui distribuição global, visto que estudos relatam linhagens isoladas em diferentes partes do mundo, mas a possui maior incidência em certas regiões, como em países da Ásia e Oriente médio, Oceania, América do Norte e América Latina (Osman et al. 2018). De acordo com os dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE), o Brasil conta com um efetivo total de 218.150.298 bovinos, 12.101.298 caprinos e 20.628.699 ovinos (IBGE 2020).

A maior prevalência do patógeno ocorre no Nordeste do país, visto que a caprinovinocultura historicamente é mais significativa nos estados desta região. O primeiro registro de caracterização de uma cepa de *C. pseudotuberculosis* no Brasil foi feito na década de 1970 e desde então alguns estudos relatam a prevalência de rebanhos contaminados (Moura-Costa, 2010).

Por exemplo, a amostragem de animais de corte com suspeita de LC em um frigorífico na Paraíba, apontou uma taxa de positividade de 74,0% (Souza et al. 2011). Um levantamento similar realizado no Distrito Federal mostrou uma taxa de infecção de 44,0% em rebanhos ovinos comerciais daquela região (Carmo et al. 2012). Em caprinos, 78,9% dos animais e 98,0% dos rebanhos estavam contaminados pelo patógeno em Minas Gerais (Seyffert et al. 2010).

Também em Minas Gerais, a soroprevalência da infecção por *C. pseudotuberculosis* e possíveis fatores de risco associados com a LC em rebanhos de ovinos no estado foi investigada onde foram coletadas amostras de 642 ovelhas de 97 fazendas. Os soros de todos os animais foram testados por ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA para anticorpos contra o patógeno. A positividade nos indivíduos foi estimada em 70,9% e nos rebanhos foi de 95,9% mostrando que a doença é amplamente disseminada em propriedades que possuem criação de carneiros (Guimarães et al. 2009).

O Estado do Pará enfrenta uma carência de dados publicados a respeito do real cenário da *C. pseudotuberculosis* dentro do contexto nacional, principalmente pelo fato de a LC e LU não serem doenças de notificação compulsória às autoridades sanitárias. No entanto, o estado é o principal criador de rebanhos de bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos da região Norte, o que ressalta a necessidade de investigação da prevalência deste patógeno para uma melhor compreensão do cenário das doenças no estado, bem como traçar estratégias para seu combate.

### 1.3.3. Imunopatogênese

Até o momento, nenhuma cepa avirulenta da espécie foi descrita, assim como também não existem relatos acerca da presença de plasmídeos em *C. pseudotuberculosis*, o que leva a crer que todos os determinantes de patogenicidade são codificados no cromossomo bacteriano, sendo a PLD seu principal e mais bem caracterizado fator de virulência. Esta exotoxina atua como um fator de permeabilidade, catalisando a dissociação da esfingomiéline – um fosfolípido constituinte da parede celular dos vasos – em colina e fosfato de ceramida. A reação catalisada pela PLD promove a disseminação de *C. pseudotuberculosis* entre os tecidos, ocasionando as lesões necróticas no hospedeiro e possibilitando a migração do patógeno para outros sítios (McNamara et al., 1994; McKean et al., 2007; Tauch & Burkovski, 2015).

Anteriormente foi demonstrado que um agrupamento constituído pelo operon *fagABC* e pelo gene *fagD*, que codificam produtos responsáveis pela captação de ferro, são importantes constituintes dos mecanismos de adaptação intracelular da bactéria, visto que este metal é um nutriente essencial para sua sobrevivência. Neste estudo, uma estirpe *knockout* para os genes Fag apresentou habilidade reduzida de sobrevivência e desenvolvimento de abscessos em cabras infectadas. Sendo um patógeno intracelular facultativo, *C. pseudotuberculosis* deve possuir a habilidade de adquirir ferro em um ambiente hostil para sua proliferação e desenvolvimento da doença (Billington et al., 2002).

A parede celular de *C. pseudotuberculosis* possui uma estrutura complexa, incluindo peptidoglicano, arabinogalactano e moléculas lipídicas conhecidas como ácidos micólicos. A alta concentração destes ácidos micólicos confere à bactéria maior proteção à ação de enzimas degradativas do complexo fagolisossômico, o que influencia diretamente em sua capacidade de sobrevivência intracelular (Burkovski 2013b).

A infecção de macrófagos de camundongo por *C. pseudotuberculosis* foi acompanhada pela observação dos componentes celulares via microscopia eletrônica, onde, alguns minutos depois que a fagocitose já havia ocorrido, as bactérias permaneceram intactas e os macrófagos foram degenerados, indicando um possível efeito tóxico dos ácidos micólicos da parede celular sob os macrófagos (Hard, 1972).

A falta de compreensão total acerca dos mecanismos de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* tem estimulado a execução de pesquisas que objetivam a identificação de novos fatores de virulência na bactéria, além dos três anteriormente citados. A enzima superóxido dismutase, codificada pelo gene *sodC* já teve seu papel investigado em *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando que contribui para a resistência através da proteção contra produtos oxidativos lançados pelos macrófagos (Piddington et al. 2001).

De acordo com dados de expressão gênica de *C. pseudotuberculosis*, foram encontrados transcritos de *sodC*, além de *cpp*, *nanH* (neuraminidase H) e *spaC* (adesina) em amostras isoladas de abscessos caprinos, apontando para um possível envolvimento dos produtos destes genes na patogenicidade da bactéria (Corrêa et al. 2018).

No decorrer do processo infeccioso, as respostas imunológicas primárias são mediadas por citocinas. Duas delas, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , estão envolvidas no combate da infecção primária e também parecem atuar na ativação durante a infecção secundária (Denis, 1991; Simmons et al. 1997). As respostas secundárias são ativadas por diferentes vias, por exemplo, várias subpopulações de linfócitos organizadas em três regiões, e complexos principais de histocompatibilidade de classe II (MHC II) intactos e foram identificados dentro das lesões encapsuladas de LC, mostrando que o recrutamento de células de defesa é uma característica da imunopatogênese de *C. pseudotuberculosis* (Ellis et al. 1991; Walker et al. 1991).

Zhou e colaboradores (2019) investigaram o comportamento de macrófagos isolados do peritônio de camundongos C57BL/6 após a infecção por *C. pseudotuberculosis*, com o intuito de averiguar o envolvimento de vias de sinalização e produção de IL-1 $\beta$ . Para isto, *knockouts* para proteínas envolvidas na montagem do inflamassoma NLRP3, conhecido ser um mediador crítico na ativação da caspase-1, foram construídos e avaliados via *Western blot*. De acordo com os achados deste estudo, a bactéria pode induzir secreção de IL-1 $\beta$  mediante a ação de NLRP3, ASC e CASP1.

Também já foi relatado que após a fagocitose, o complexo fagossômico diminui seu pH, com o objetivo de danificar o conteúdo celular e afetar negativamente o metabolismo do patógeno (Figura 3). Além disto, outros tipos de estresses intracelulares afetam a bactéria, incluindo choques oxidativos, térmicos e nitrosativos, e tensões de superfície e osmóticas (Pinto et al. 2014a).

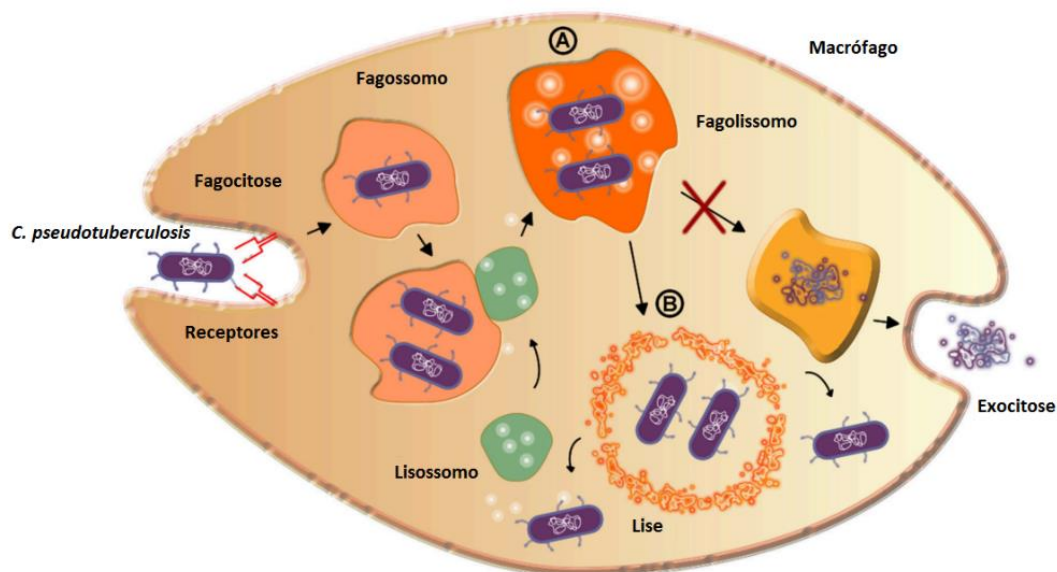


Figura 3. Processo de fagocitose entre *C. pseudotuberculosis* e macrófago.  
 Fonte: Oliveira et al., 2017, adaptado.

Pépin e colaboradores (1994) observaram que em lesões nos primeiros estágios da doença, as células T CD4+ estão mais presentes, ao passo que as células T CD8+ constituem a maior população em lesões mais avançadas. A resposta imune adaptativa, seja celular ou humoral, é responsável pela formação dos granulomas como uma das estratégias para a contenção do patógeno. Ademais, o recrutamento de células CD4 e CD8 no tecido linfóide e a elevada concentração de células T CD8+ no interior da cápsula caseosa já foram identificados (Walker et al. 1991).

Entretanto, a ativação destes mecanismos por parte do sistema imune do hospedeiro não é capaz de eliminar a célula invasora, que consegue sobreviver dentro dos macrófagos. Esta persistência intracelular é essencial para a migração da bactéria do sítio de infecção inicial para os nódulos linfáticos e outros tecidos. Sendo assim, uma vez contornadas as barreiras impostas pelo sistema imune no indivíduo infectado, *C. pseudotuberculosis* se estabelece definitivamente no organismo causando as infecções crônicas (Paule et al., 2003; Baird & Fontaine, 2007).

#### 1.3.4. Diagnóstico

O método de diagnóstico mais comum para a identificação de *C. pseudotuberculosis* consiste na avaliação clínica dos animais seguida da obtenção da bactéria a partir material caseoso retirado das lesões. Após o isolamento, é recomendada a adoção de diferentes estratégias para uma confirmação mais precisa do resultado. Análises microbiológicas e bioquímicas são as mais disseminadas devido à facilidade e baixo custo operacional. Dentre elas, incluem-se a avaliação da morfologia das colônias e formação de grânulos em meio líquido, a presença ou ausência de  $\beta$ -hemólise, análises morfotintoriais e testes enzimáticos pelo sistema padronizado API Coryne<sup>®</sup>, comercializado pela empresa bioMérieux Inc (Freney et al., 1991; Al-Gaabary et al., 2009; Ferrer et al., 2009).

Análises baseadas em biologia molecular, especialmente a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) e suas variantes também vêm sendo usadas nas últimas décadas por serem mais sensíveis e específicas comparadas aos métodos tradicionais. O estudo pioneiro neste âmbito propôs a PCR baseada na amplificação do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do rRNA. Entretanto, devido à proximidade filogenética com *C. ulcerans*, foi identificada reação cruzada entre as duas espécies (Çetinkaya et al. 2002).

A disseminação da técnica como uma estratégia eficaz para o diagnóstico ocorreu, de fato, com a PCR multiplex (Pacheco et al., 2007). A reação consiste na amplificação de três importantes genes do patógeno: *rrs*, *rpoB* e *pld*, contornando os problemas relacionados à falta de especificidade do gene 16S amplificado isoladamente. Além disto, a implementação da variante PCR quadruplex possibilitou a identificação de qual dos dois biovares o isolado pertence, além da confirmação da espécie (Almeida et al. 2017).

Alternativamente, testes sorológicos também podem ser utilizados para o diagnóstico de LC, como hemaglutinação indireta, inibição de hemólise e ELISA baseado na detecção do anticorpo IgG. Entretanto, apesar de úteis, estas metodologias são passíveis de sofrer reações cruzadas e resultados inespecíficos (Kaba et al., 2001; Hariharan et al., 2015).



Abordagens proteômicas vêm ganhando força para a identificação de bactérias de interesse clínico, por fornecer o diagnóstico de maneira rápida e confiável. A espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voe (MALDI-TOF MS), por exemplo, já foi adotada para a detecção de diversas estirpes do gênero *Corynebacterium* isoladas de diferentes amostras clínicas (Seng et al. 2013).

#### 1.3.5. Terapia

Apesar dos esforços para erradicar ou pelo menos minimizar os prejuízos derivados de infecções por *C. pseudotuberculosis*, ainda não existem métodos de tratamento completamente eficazes. Esta espécie bacteriana é resistente à nitrofuranos, ciclohexemida e ácido nalidíxico, mas apresenta suscetibilidade à diversos outros tipos de antibióticos, como penicilina, macrolídeos, tetraciclina, cefalosporinas, lincomicina e clorafenicol (Abebe & Sisay Tessema 2015).

Entretanto, a antibioticoterapia apresenta um elevado custo e não se mostra completamente efetiva devido à natureza fibrosa da cápsula de tecido conectivo que reveste os abscessos e a densidade do material caseoso no interior dos granulomas, que dificultam sua ação (Judson & Songer, 1991). Portanto, a imunização se mostra como uma excelente alternativa contra a disseminação de *C. pseudotuberculosis*.

Neste sentido, a empresa Zoetis disponibiliza no mercado a Glanvac<sup>®6</sup>, uma vacina que combina a PLD recombinante (rPLD) inativada de *C. pseudotuberculosis* para o combate da LC, além de toxóides de diferentes espécies de *Clostridium spp.*, que são os agentes etiológicos de enterotoxemia, carbúnculo sintomático, edema maligno, hepatite necrótica e tétano em pequenos ruminantes. Apesar da iniciativa, a vacina não é completamente efetiva, pois apresenta níveis de proteção variáveis, além de não se encontrar disponível em diversos países (Hodgson et al., 1999; Fontaine et al., 2006).

Silva e colaboradores (2018) avaliaram o potencial de vacinas de subunidade contendo as proteínas rCP09720 e rCP01850 em associação com a rPLD para induzirem resposta imune significativa e promover a proteção em camundongos BALB/c. Os animais foram infectados com *C. pseudotuberculosis* e imunizados duas vezes com rPLD, rPLD+rCP09720 e rPLD+rCP01850. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0 (pré-imunização), 21 (após a primeira imunização) e 42 (após a segunda imunização) e avaliadas através da taxa de proteção para cada grupo de vacina testado, calculada com base na sobrevivência dos animais imunizados. Durante os 40 dias após o desafio, os animais foram avaliados diariamente, e a taxa de mortalidade foi registrada. O grupo imunizado com rPLD+rCP01850 apresentou a maior taxa de proteção comparado com os demais, indicando um possível novo antígeno que pode ser utilizado contra a LC.

Devido à falta de tratamento efetivo, a intervenção cirúrgica é uma medida adotada para o controle da disseminação da bactéria. Entretanto, a extirpação dos abscessos é considerada uma conduta cercada de riscos, visto que o extravasamento do material caseoso pode contaminar o ambiente, causando efeito contrário se as medidas necessárias não forem tomadas, sendo ainda inviável a realização deste procedimento em animais que apresentam o quadro clínico visceral da doença (Pugh & Baird, 2012).

As nanopartículas de prata (AgNP) têm despertado o interesse de pesquisadores devido à comprovação de suas atividades antibacterianas e contribuição para a boa cicatrização de lesões (Zhang et al. 2016). A utilização destes compostos foi testada em animais infectados por *C. pseudotuberculosis*, que tiveram seus linfonodos excisados e foram acompanhados durante o período pós-cirúrgico. Os resultados mostraram que os indivíduos tratados com AgNP apresentaram o processo de cicatrização mais acelerado quando comparados com o grupo de animais tratados com iodo 10%, e ainda acumularam uma quantidade menor de material purulento, indicando o uso de AgNP como um promissor método alternativo de tratamento (Santos et al. 2019).

Portanto, a profilaxia se mostra como uma medida econômica e simples que deve ser adotada para minimizar o risco de infecção. Para isto, as baias de contenção e pastos devem ser higienizados regularmente, os animais com suspeita clínica devem ser isolados do rebanho, cuidado ao realizar a tosquia e uso de desinfetantes – hipoclorito de sódio, permanganato de potássio e peróxido de hidrogênio – são altamente recomendados (Al-Gaabary et al. 2009; Santiago et al. 2013).

#### 1.4. Sistema mononuclear fagocitário

O sistema imune possui uma rede complexa de células e moléculas responsáveis pela manutenção da homeostase e imunidade dos organismos perante a presença de agente invasores através da promoção uma cascata de respostas com o objetivo de eliminá-los. De acordo com características anatômicas, as células constituintes deste sistema podem ser subdivididas em dois grupos: monocítico-macrofágico – que compõe o sistema mononuclear fagocitário (SMF) – e o linfocítico, onde, em suma, o primeiro atua na ação imediata de combate à agentes exógenos através da fagocitose e apresentação de antígenos às células do segundo, que por sua vez promovem reação à defesas específicas (Hume et al. 2019).

A fagocitose é um fenômeno que ocorre como mecanismo da imunidade inata, e que foi demonstrada pela primeira vez pelo biólogo ucraniano Élie Metchnikoff no fim do século XIX através da observação da ingestão de partículas por células móveis. Posteriormente estas células foram classificadas como fagócitos, e subdivididas de acordo com o tamanho em micrófagos e macrófagos, onde ambas apresentaram ter envolvimento na resistência a infecções. Entre outras características desta categoria, as células do sistema mononuclear fagocitário possuem atividade endocítica, são ricas em esterases e hidrolases lisossomais e expressam receptores que promovem a fagocitose (Gordon & Plüddemann, 2019).

O conhecimento adquirido ao longo do último século levou a comunidade científica a crer que os macrófagos se originam exclusivamente células-tronco hematopoiéticas, maturadas em monócitos que migram pelo organismo através da corrente sanguínea até se fixarem em tecidos específicos, onde se diferenciam (Varol et al. 2015). Entretanto, uma série de estudos mais recentes têm demonstrado que macrófagos residentes em tecidos (MRT) podem ser estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário e persistem independentemente da diferenciação de pró-monócitos (Epelman et al. 2014).

De acordo com Zhang (2021), apesar da origem de MRT ainda não ser completamente compreendida, sabe-se que estas células são derivadas de diversos progenitores, tanto de origem embrionária como de monócitos, tais como células de Kupffer, macrófagos alveolares, esplênicos e peritoneais do pulmão que são desenvolvidos antes do nascimento e podem se manter independentes dos monócitos circulantes do sangue.

Macrófagos desempenham papéis importantes na progressão de diversas doenças, incluindo arteriosclerose (Bobryshev et al. 2016), diabetes (He et al. 2019) e câncer (Cendrowicz et al. 2021). No que confere ao processo infeccioso e combate à ação de patógenos, além da fagocitose estas células também são responsáveis pela apresentação de antígenos e a produção de citocinas. Promovem ainda o reparo tecidual e cicatrização de lesões, contribuem para danos e patologia tecidual durante infecções.

A polarização é outra de suas características primordiais, e consiste em um processo onde os macrófagos adquirem um fenótipo específico e uma resposta funcional dependente de estímulos ambientais que encontram nos tecidos. Diferentes classes de macrófagos já foram descritas em várias espécies, tendo como base principalmente a expressão de marcadores de superfície, atividade biológica e produção de fatores tecido-específicos (Murray, 2017).

Dois fenótipos de macrófagos são conhecidos, dependendo da via de ativação. Pela via clássica, o M1 é estimulado por ligantes citocinas pró-inflamatórias, como TLR e IFN- $\gamma$ , alta produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio e forte potencial microbicida e tumoricida. A via alternativa é regulada por IL-4 e IL-13 e polariza o fenótipo M2, onde os macrófagos estão envolvidos na contenção do microrganismo, remodelação tecidual, progressão tumoral e atividade imunorregulatória. Além disto, possuem elevada capacidade, expressão de moléculas sequestrantes, expressão de receptores de manose e galactose, produção de ornitina e poliaminas (Benoit et al. 2008; Liu et al. 2014).

Através de análises de transcriptoma é possível verificar a ação de genes envolvidos na ativação de macrófagos em diferentes estágios. Zhang e colaboradores (2018) fizeram uso da técnica de RNA-Seq para quantificar e comparar os transcriptomas das populações de mRNA e miRNA de macrófagos humanos infectados por variantes patogênicas do vírus influenza A H5N1 atenuadas do vírus H1N1. Os resultados apontaram que as subpopulações M1 e M2 respondem distintamente à infecção pelo vírus H5N1 quando comparado ao vírus H1N1 e que ocorre expressão alterada de genes de nas vias de ativação implicados na resposta viral do hospedeiro especificamente no subtipo M1.

### 1.5. Células THP-1

O monócito THP-1, descrito pela primeira vez por Tsuchiya e colaboradores na década de 1980, foi isolado a partir do sangue periférico de um paciente de 1 ano de idade acometido por leucemia mieloide aguda subtipo M5. Este trabalho demonstrou que THP-1 apresenta capacidade citolítica dependente de anticorpo, capacidade fagocítica quando diferenciada em macrófago, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya et al. 1980). Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa identificou que o processo de diferenciação *in vitro* pode ocorrer com mais eficácia através do uso de compostos tipo ésteres de forbol, especialmente 12-otetradecanolforbol-13-acetato – TPA e forbol-12-miristato-13-acetato – PMA (Tsuchiya et al. 1982).

Atualmente, o tratamento de THP-1 com PMA é amplamente difundido para diferenciação, apresentando melhores resultados quando comparado com o uso de outros agentes indutores (Daigneault et al. 2010). Por meio da análise microscópica é possível definir a diferenciação de monócitos THP-1, visto que neste estágio as células permanecem em suspensão no meio de cultivo e apresentam morfologia arredondada, e após a diferenciação com PMA, os macrófagos são predominantemente alongados e achatados e se acomodam aderidos ao fundo do frasco, resultando em um cultivo em monocamada (Gogulamudi et al. 2015), como mostrado na Figura 4.

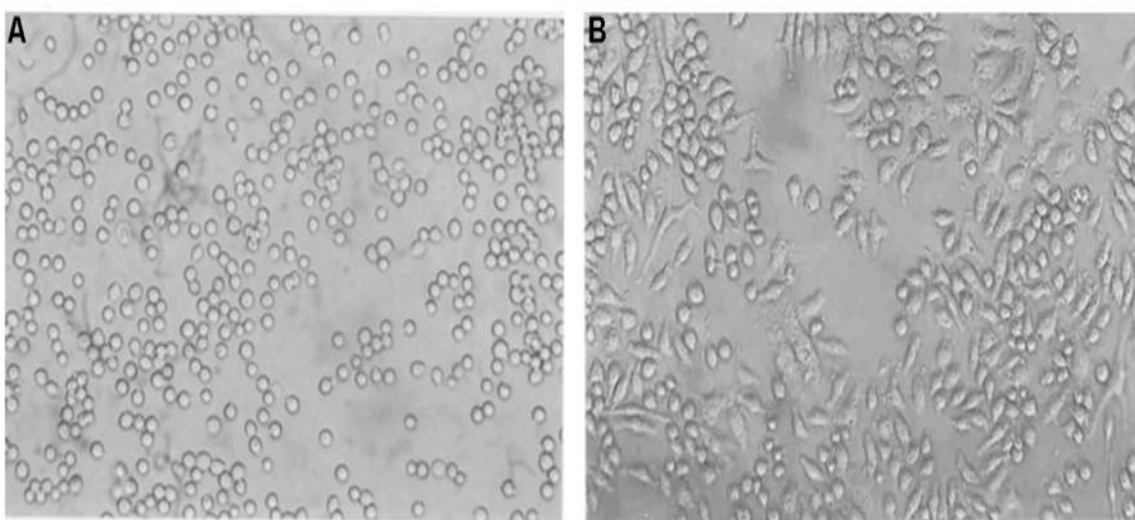


Figura 4. Cultivo de (A) monócitos e (B) macrófagos diferenciados.  
Fonte: Gogulamudi et al., 2015.

Estudos baseados no cultivo de THP-1 apresentam diversas vantagens quando comparados aos que adotam macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*), como o tempo médio de replicação, podendo quadruplicar em três dias, a facilidade de manipulação e a ausência de vírus infecciosos e produtos tóxicos (Chanput et al. 2014).

Outrossim, por ser considerada uma linhagem celular imortal, THP-1 pode ser cultivada até 25 passagens – cerca de 3 meses – sem qualquer tipo de alteração na atividade celular e na sensibilidade, diferentemente de monócitos/macrófagos derivados de PBMC, que necessitam de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e LPS) como agentes de sobrevivência e prevenção de apoptose (Mangan et al. 1991).

O armazenamento também é um fator determinante na escolha do uso de THP-1 em detrimento de PBMC, visto que podem ser armazenados por anos em nitrogênio líquido e serem reativados sem qualquer tipo de inconveniente, mediante o uso de protocolos adequados. Por fim, o background genético de THP-1 é bastante homogêneo, o que minimiza a variabilidade fenotípica celular e facilita a reprodutibilidade de resultados em estudos que levam em consideração aspectos genéticos da linhagem, inclusive ensaios de expressão gênica (Rogers et al., 2003; Chanput et al., 2014).

Embora a diversidade fenotípica de macrófagos não possa ser completamente reconstituída *in vitro*, células cultivadas sob condições bem definidas se mostram importantes para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, e esta linhagem celular tem sido utilizada para a investigação das relações em diferentes espécies bacterianas.

Por exemplo, três diferentes serovares de *Salmonella enterica* – Typhimurium, Enteritidis e Choleraesuis – tiveram o papel de seus respectivos plasmídeos de virulência associados aos serovares (psV) analisados quanto à capacidade de invasão e sobrevivência intracelular em THP-1. Os resultados deste estudo mostraram que os psV diferem em tamanho, composição gênica e potencial patogênico dentre os isolados, em especial os pertencentes ao serovar Choleraesuis, que apresentaram maior taxa de indução à apoptose nos macrófagos (Huang et al. 2019).

Análises do transcriptoma de THP-1 podem fornecer novas informações acerca da regulação e expressão de genes envolvidos no decorrer do processo infeccioso. *Candida albicans* é uma espécie de fungo diplóide constituinte da microbiota normal de membranas monocutâneas e do trato alimentar que pode causar infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. Uma análise de *microarray* de células THP-1 estimuladas com *C. albicans* mortas por calor identificou o perfil de genes induzidos e reprimidos pelo hospedeiro, onde, diversos genes que foram regulados negativamente estão envolvidos com vias de sinalização do sistema imunológico (Hu et al. 2016).

Alguns patógenos intracelulares possuem a capacidade de modular a expressão de genes de defesa do hospedeiro através de modificações epigenéticas, de modo a contribuir para a sobrevivência intracelular. Células THP-1 infectadas por *M. tuberculosis* H37Rv, por exemplo, tiveram o gene da IL-12B reprimido pela mediação da histona desacetilase HDAC1, que pode adaptar as respostas em hospedeiros suscetíveis e fazer a bactéria persistir no processo infeccioso impedindo as respostas pró-inflamatórias lançadas pelo macrófago (Chandran et al. 2015).

## 1.6. Ciências Genômicas

O estabelecimento do sequenciamento de DNA pelo método de terminação de cadeia de Sanger deu início a uma revolução na Genética, pois através desta técnica foi possível adquirir uma nova visão sobre o conjunto de genes de um organismo e sua organização no genoma. Além do mais, forneceu informações importantes sobre processos biológicos, servindo ainda de base para estudos nas áreas da transcriptômica e proteômica (Schuster, 2008; Dijk et al., 2018).



Em meados da década de 1990, os primeiros genomas bacterianos – *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium* – foram sequenciados, implementando o uso da tecnologia *Whole Genome Shotgun* (WGS), que fragmenta o DNA randomicamente e o insere em plasmídeos para a preparação de bibliotecas genômicas em *Escherichia coli*. Posteriormente, os clones são sequenciados e montados para a reconstrução da sequência completa (Fleischmann et al. 1995; Fraser et al. 1995). Anos mais tarde, a publicação do primeiro rascunho do genoma humano por Venter e colaboradores (2001) impulsionou empresas a desenvolverem novos sequenciadores, capazes de gerar resultados mais rapidamente, com menor custo e utilização de mão-de-obra.

Desta forma, em 2004 a multinacional suíça Roche/454 Life Sciences lançou no mercado a primeira linha de sequenciadores de alto rendimento, o 454 GS 20, dando início ao sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*). A partir de então, diversos equipamentos foram lançados, aprimorados e descontinuados em detrimento de sequenciadores cada vez mais modernos e com capacidade de processamento superiores, com destaque para MiSeq, HiSeq e NextSeq (Illumina), Ion Torrent PGM e Ion Proton (Thermo Fisher Scientific), *Single Molecule, Real-Time* - SMRT (PacBio) e PromethION (Oxford Nanopore Technologies) (Liu et al. 2012; Merriman et al. 2012; Vincent et al. 2017).

A quantidade de dados gerados pelo sequenciamento requer a utilização de diversas ferramentas de bioinformática para a interpretação dos dados e atribuição de informações biológicas. Por exemplo, a montagem dos genomas é necessária devido à fragmentação que ocorre no preparo da biblioteca de DNA antes do sequenciamento propriamente dito, onde as leituras geradas são reconstruídas em sequências contíguas, que podem ou não ser alinhadas contra um genoma de referência. Ademais, após a montagem é recomendado fazer uso da anotação funcional, que realiza a análise do genoma-alvo e associa o conhecimento biológico existente para inferir o do produto gênico das sequências analisadas (Dominguez Del Angel et al. 2018).

Apesar da enorme contribuição de pesquisas em genômica estrutural, as análises proporcionadas por ela de forma isolada não são capazes de permitir a definição da função dos genes mediante estímulos externos, visto que para uma proteína ser traduzida, precisa primeiramente que o DNA seja transcrito em mRNA, e este posteriormente fornecerá a informação requerida para o direcionamento de sua síntese. Contudo, genes não estão ativos a todo momento na célula, e são recrutados quando seu papel é necessário em determinado processo biológico, sendo o transcriptoma caracterizado como o conjunto de genes expressos em uma célula sob uma determinada condição fisiológica ou um estado de desenvolvimento em um período específico (Morozova & Marra, 2008; Lowe et al. 2017).

Por conta do crescente avanço da genômica funcional, algumas tecnologias e métodos de alto rendimento foram desenvolvidos para análise de expressão gênica em larga escala. O método de hibridização (*microarray*), por exemplo, consiste em um arranjo pré-definido de moléculas de DNA quimicamente ligadas à uma superfície sólida revestidas com compostos como polilisina e poliacrilamida. Esta metodologia se baseia na detecção e quantificação de DNA e RNA de interesse que são hibridizados com os ácidos nucleicos fixados no chip através da complementaridade de bases, e a detecção ocorre pela geração de sondas marcadas com compostos fluorescentes. Entretanto, os *microarrays* apresentam problemas com hibridização cruzada, elevada taxa de ruídos e são restritos apenas a análise de mRNAs conhecidos (Lowe et al., 2017; Rani & Sharma, 2017).

Comparado com a metodologia supracitada, o sequenciamento de RNA por plataformas NGS – RNA-seq – apresenta diversos benefícios, pois permite a cobertura de transcritos em escala genômica, é capaz de detectar regiões de íntrons e intergênicas transcritas, eventos regulatórios como o *splicing* alternativo e expressão de isoformas diferenciais (Wang et al. 2009).

Atualmente, o RNA-seq pode ser considerado uma ferramenta ideal para a análise de transcriptomas completos, investigação do perfil de expressão e caracterização de genes diferencialmente expressos, sendo, desta forma extremamente útil para desvendar os mecanismos de virulência e patogenicidade em microrganismos, por exemplo (Sharma & Vogel, 2014; Wittchen et al., 2018).

Por fim, a proteômica se mostra uma abordagem complexa devido a diversos fatores, e o principal deles é o fato de que proteínas são macromoléculas que sofrem modificações bioquímicas pós-traducionais. Esta abordagem é capaz de fornecer informações mais completas e avançadas no estudo de sistemas biológicos. Para a determinação quantitativa de proteínas duas abordagens são mais comumente utilizadas: a eletroforese bidimensional (2D), que permite a identificação e quantificação das proteínas presentes em uma amostra biológica através das diferenças entre seus pontos isoelétricos, e a espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometry*), uma técnica sensível, onde proteínas são digeridas para a obtenção de um conjunto de peptídeos, permitindo a determinação da fórmula molecular de qualquer estrutura com alta precisão (Van Oudenhove & Devreese, 2013; Joshi & Patil, 2016; Schubert et al., 2017).

#### 1.6.1. RNA-seq

No decorrer do processo infeccioso, a interação entre o patógeno e o hospedeiro ocasiona uma cascata dinâmica em larga escala que promove alterações na expressão gênica dentro de ambos os organismos, resultando na adesão e persistência do patógeno ou à sua eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro.

Desta maneira, a busca pela compreensão global e imparcial dos transcritos ativos durante o evento pode fornecer interessantes perspectivas, especialmente no que diz respeito à identificação de fatores de virulência ainda não conhecidos, bem como a elucidação de novas vias que respondem à exposição a patógenos específicos ou PAMP na célula hospedeira (Westermann et al., 2012; Marsh et al., 2017).

O método convencional para a investigação do perfil de expressão de patógeno e hospedeiro baseado em *microarrays* possibilitou importantes avanços na compreensão dos mecanismos de interação entre diversas bactérias e seus hospedeiros, como *Vibrio cholerae* e *Salmonella enterica* (Merrell et al., 2002; Eriksson et al., 2003), contudo, a partir desta abordagem não é possível analisar simultaneamente os transcritos dos dois organismos envolvidos, sendo necessária a separação das células do patógeno e do hospedeiro antes da análise dos arranjos (Figura 5). Além disto, os *microarrays* são limitados à análise de RNAs codificantes, não sendo possível a avaliação de sequências contidas em regiões intergênicas (Westermann et al. 2012).

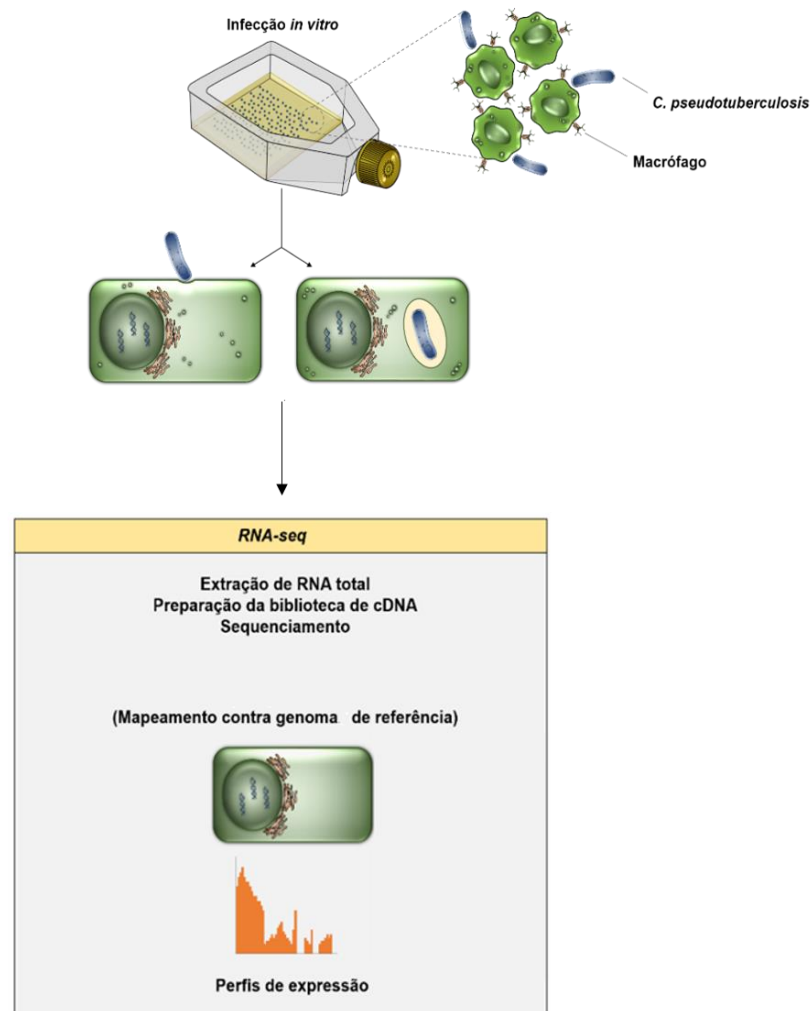


Figura 5. Representação do uso de análises de expressão gênica de macrófagos infectados *in vitro* por uso de RNA-seq.

Neste contexto, a utilização da técnica Dual RNA-seq tem se mostrado uma poderosa ferramenta para a análise da complexa dinâmica de interação entre agentes infecciosos e seus hospedeiros. Derivada do RNA-seq convencional, que leva em consideração a expressão de transcritos de uma amostra biológica perante determinados fatores ambientais. Esta metodologia vem sendo aplicada com sucesso para estudos de transcriptômica em diferentes tipos celulares e agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários (Fabozzi et al., 2018; Kovalchuk et al., 2019; Montoya et al., 2019; Mukherjee & Heitlinger, 2019).

Devido às diferenças do conteúdo celular intra-espécies, é importante ressaltar os cuidados com a manipulação das amostras, a presença ou ausência de parede celular sugere diferentes estratégias para a etapa de lise, além da concentração de RNA que varia significativamente entre organismos procariotos e eucariotos, sendo necessária uma elevada cobertura das leituras geradas no sequenciamento (Wolf et al. 2018).

#### 1.6.2. Impacto das Ciências Genômicas no estudo de *C. pseudotuberculosis*

Segundo informações do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), o Brasil é o país que detém a maior quantidade de genomas da espécie *C. pseudotuberculosis* depositados, e grande parte destes projetos foram fruto da ação conjunta firmada entre a Rede Paraense de Genômica e Proteômica e a Rede Genoma de Minas Gerais. Apesar da ausência de estudos epidemiológicos sobre a incidência da bactéria no Estado do Pará, o isolamento, caracterização e sequenciamento dos genomas de oito cepas isoladas em diferentes mesorregiões nos últimos anos mostra que o patógeno é disseminado nos rebanhos do estado (Alves et al., 2016; Muge et al., 2016; Costa et al., 2017).

Soares e colaboradores (2013), reportaram pela primeira vez as características genômicas de *C. pseudotuberculosis* 258, uma cepa-modelo do biovar *equi*, mostrando que três ilhas de patogenicidade de cepas deste biovar apresentam regiões de deleção comparadas ao biovar *ovis*. Além disto, este mesmo trabalho aplicou a vacinologia reversa (VR) e identificou 49 proteínas com potencial antigênico nas linhagens 1002, CIP52.97 e 258.

A VR é uma estratégia que consiste na triagem do genoma do patógeno aplicado em *pipelines in silico* para explorar e encontrar antígenos não convencionais, e tem ganhado forças graças à difusão de dados genômicos e melhoria de programas de bioinformática (Rappuoli, 2001; Kanampalliar et al., 2013).

Esta metodologia já foi aplicada em *C. pseudotuberculosis* adotando diferentes abordagens, porém geralmente baseadas no *screening* de candidatos no exoproteoma – o conjunto de proteínas secretadas e potencialmente expostas à superfície – para definir os candidatos a vacinas contra o patógeno, visto que elas são mais propensas a serem expostas às células do sistema imune do hospedeiro (Pacheco et al. 2011; Santos et al. 2012).

Neste âmbito, um estudo aplicou a VR por meio de dois diferentes *pipelines*, para prever candidatos vacinais presentes no conjunto de genes compartilhados por 65 cepas de *C. pseudotuberculosis*. Os 768 ortólogos foram analisados quanto ao perfil de expressão gênica obtido por RNA-seq, onde, os 230 induzidos foram avaliados quanto à localização sub-celular, peso molecular, homologia com genes dos hospedeiros, quantidade de hélices transmembrana, densidade de epítomos maduros (MED) e potencial de antigenicidade, identificando seis proteínas com potencial uso para o desenvolvimento de vacinas contra a bactéria (Araújo et al. 2019).

No que confere a análises de transcritos, estudos de RNA-seq para investigar o perfil de expressão de *C. pseudotuberculosis* em face de condições abióticas enfrentadas pela bactéria durante a infecção no hospedeiro foram realizados. A linhagem 1002, biovar *ovis*, foi submetida a estresse ácido, térmico e osmótico, mostrando que grande parte dos genes expressos são relacionados a oxidação e redução, a divisão celular e ao ciclo celular. O *stimulon* dos três estresses apresentou genes que participam dos mecanismos de virulência, defesa contra o estresse oxidativo, adesão e regulação, revelando a importância dos produtos destes genes no processo infeccioso (Pinto et al., 2012; Pinto et al., 2014).

Em *C. pseudotuberculosis* 258, 113 genes foram considerados induzidos mediante choque térmico, em especial *hspR*, *grpE*, *dnaK* e *clpB*, fortemente envolvidos com mecanismos de adaptação a altas temperaturas (Gomide et al., 2018a). A influência dos estresses osmótico e ácido também foi avaliada nesta mesma cepa, e o gene *dps*, que codifica uma proteína capaz de captar ferro no meio intracelular e contribui para a proteção bacteriana contra estresse ácido, oxidativo e térmico apresentou elevados níveis de expressão em ambas as condições, bem como na linhagem 1002, apontando-o como um importante alvo para estudos relacionados ao combate tanto da LU quanto da LC (Gomide et al., 2018b).

Ibraim e colaboradores (2019) verificaram os níveis de expressão gênica das cepas T1 (selvagem) e Cp13 (mutante para o gene *ciuA*, codificante de proteína de ligação ao sideróforo) perante a limitação de ferro, e diversos genes expressos que fazem parte dos mecanismos de transporte de hemina, estão localizados dentro de ilhas de patogenicidade. Esta análise de transcriptoma foi capaz de fornecer informações acerca dos mecanismos para captação deste nutriente essencial, sendo um importante passo para entender a forma com que *C. pseudotuberculosis* é capaz de se adaptar e sobreviver intracelularmente no hospedeiro.

Os dados de transcriptoma publicados até o presente momento foram capazes de fornecer base para a compreensão de seu comportamento mediante diferentes estímulos. Alvos como *phoP*, *dtxR*, *ripA* e *glxR*, e fatores sigma são ativamente expressos se mostraram como fatores chave de transcrição, e por esta razão, análises mais aprofundadas dos produtos destes genes podem fornecer novos direcionamentos tanto para o diagnóstico e o tratamento das doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*, quanto para a identificação de melhores alvos terapêuticos e candidatos vacinais (Parise et al. 2021).

O acesso às tecnologias de alto rendimento contribuiu substancialmente para a melhor compreensão de mecanismos básicos da fisiologia do patógeno, vias regulatórias, além da identificação de possíveis fatores de virulência e a predição de novos alvos terapêuticos e vacinais. Entretanto, em relação a infectividade do patógeno, os eventos que dificultam a degradação da *C. pseudotuberculosis* por macrófagos não são esclarecidos.

Tanto o patógeno quanto o hospedeiro buscam respostas rápidas, adaptativas e eficazes para a própria sobrevivência. Assim, perceber a alteração no ambiente e transmitir a informação montando uma rede de respostas ideais é primordial para entender o comportamento de ambos os organismos no decorrer do processo infeccioso. Desta forma, este trabalho é um modelo de estudo que busca identificar quais genes são ativos durante o primeiro contato entre *C. pseudotuberculosis* e o macrófago, conhecer a cascata de resposta em nível transcricional do hospedeiro, o que pode abrir possibilidades para busca de soluções eficazes contra os problemas causados por esta bactéria.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil de genes diferencialmente expressos de macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 mediante infecção *in vitro* por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Prospectar, isolar e identificar cepas de *C. pseudotuberculosis* no Estado do Pará;
- Descrever a arquitetura genômica e avaliar funcionalmente um isolado de *C. pseudotuberculosis*;
- Estabelecer um protocolo adequado de infecção *in vitro* de macrófagos derivados de THP-1 por *C. pseudotuberculosis*;
- Analisar os genes expressos pelo hospedeiro durante o processo de infecção *in vitro*.
- Avaliar o repertório de transcritos diferencialmente expressos quanto à sua classificação funcional.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção do material biológico

A prospecção de amostras do patógeno foi realizada no segundo semestre de 2018 em uma propriedade particular na Mesorregião Nordeste Paraense, após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPA (CEUA – UFPA), processo de nº 9220240518 (Apêndice 1), mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 2) pelo responsável do local.

As bactérias foram obtidas a partir de três ovinos adultos da raça Mestiço Morada Nova com diagnóstico clínico de LC, que foram identificados e confinados para a obtenção dos materiais caseosos via punção. As amostras biológicas foram então armazenadas em tubos estéreis e transportadas em gelo ao Laboratório de Genômica e Bioinformática (LGB) para as análises subsequentes.

#### 3.2. Cultivo bacteriano

Para o isolamento e cultivo microbiano, primeiramente os materiais caseosos foram adicionados em solução salina a 0,9%, sendo estas suspensões submetidas a diluições seriadas ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) e plaqueadas em meio ágar-sangue de carneiro a 5% (Laborclin) a 37°C por 48 horas, em triplicata.

Após o período de crescimento, as colônias hemolíticas foram então cultivadas em meio seletivo ágar chocolate suplementado com telurito de potássio (ACT) a 0,03% a 37°C por 48 horas. Por fim, os isolados foram inoculados em meio BHI semi-sólido (Kasvi) a 37°C por 48 horas, armazenados em soluções contendo glicerol a 20% e 45%, e depositados a -80°C no repositório do LGB.

### 3.3. Avaliação de aspectos microbiológicos

A análise microbiológica foi realizada através da identificação do padrão positivo para  $\beta$ -hemólise das colônias, do crescimento em meio seletivo para o gênero *Corynebacterium* e da avaliação morfológica das colônias em meio ágar BHI. Além disto, todas as amostras que atendiam aos critérios anteriormente citados foram analisadas quanto às características morfotintoriais por meio de coloração de Gram (Laborclin).

### 3.4. Identificação molecular da espécie

Para a extração do DNA genômico, as bactérias foram cultivadas em 15 mL de meio BHI caldo a 37°C por 48 horas a 160 rpm em uma incubadora tipo *shaker* (New Brunswick Scientific), onde, posteriormente as biomassas bacterianas foram concentradas através de centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos e submetidas à extração pelo método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, realizado de acordo com o protocolo descrito por Moore & Dowhan (2002). A qualidade do DNA foi avaliada através de gel de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X e visualizado em transiluminador UV. A concentração foi determinada pelo equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen), através do Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen).

Um ensaio de PCR quadruplex foi adotado para a confirmação da espécie *C. pseudotuberculosis* por meio da amplificação dos genes *pld*, *rpoB* e *rrs*, além da determinação de biovar pela presença ou ausência do amplicon referente ao gene *narG* (Tabela 1). O DNA genômico das cepas *C. pseudotuberculosis* 1002 (biovar *ovis*) e 258 (biovar *equi*) foram utilizadas como controles positivos da reação.

A PCR foi executada pelo protocolo do GoTaq® Green Master Mix (Promega), onde a desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minuto. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X e visualizados em transiluminador UV.

Tabela 1. Lista de primers utilizados na PCR quadruplex

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)
<i>rrs</i>	Forward	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816
	Reverse	TCTCTACGCCGATCTTGTAT	
<i>rpoB</i>	Forward	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446
	Reverse	TCCATTTGCGCCGAAGCGCTG	
<i>pld</i>	Forward	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203
	Reverse	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG	
<i>narG</i>	Forward	ACCCGTACTIONTGCATIONTTTC	612
	Reverse	AGTCAGTACTTCCGCAGGTC	

### 3.5. Análise proteômica

A técnica MALDI-TOF MS foi adotada para ratificar os métodos supracitados para a confirmação definitiva da espécie. Para esta análise, uma unidade formadora de colônia (UFC) de cada cepa foi coletada e espalhada em uma placa de aço e cobertas com 1 µL de IVD Matrix Solution (Bruker Daltonics).

Após a secagem, as amostras foram depositada no equipamento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), de acordo com as recomendações do fabricante. Os perfis de espectro de diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* foram comparados aos espectros gerados pelo equipamento, onde valores  $\geq 2.3$  classificam identificação segura da espécie.

### 3.6. Curva de crescimento de bacteriano

A dinâmica de crescimento de uma cepa de *C. pseudotuberculosis* foi definida através da mensuração da densidade óptica (DO) da suspensão bacteriana em comprimento de onda de 600 nm. Para isto, um isolado foi cultivado em meio BHI caldo acrescido de Tween<sup>®</sup> 80 por 48 horas a partir de 1 UFC e submetido à agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (New Brunswick Scientific).

O crescimento celular foi monitorado em intervalos de 1 hora, através da retirada de 1 mL de cultura para a leitura em espectrofotômetro. O cálculo de células por mL foi feito por meio da medição da  $DO_{600nm}$  na fase exponencial de crescimento bacteriano. As suspensões foram cultivadas em meio BHI-ágar em fatores de diluição  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para a contagem das UFC.

### 3.7. Sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*

Uma cepa pré-selecionada de *C. pseudotuberculosis* foi cultivada em meio BHI caldo conforme as condições descritas no item 3.4, e o DNA genômico foi extraído através do kit DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil Kit® (Qiagen), de acordo com as orientações do fabricante. A concentração de DNA foi calculada pelo Qubit® 2.0 (Invitrogen).

O controle de qualidade da extração foi avaliado através do grau de pureza da amostra, por meio da taxa de absorvância 260/280 nm calculada pelo espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Além disto, o nível de fragmentação do DNA foi determinado por eletroforese capilar equipamento Fragment Analyzer (Agilent Technologies) e visualizado no ProSize Data Analysis (Agilent Technologies).

A biblioteca de sequenciamento foi preparada através do Nextera XT Sample Prep Kit (Illumina) com indexação multiplex, de acordo com o protocolo do fabricante, seguida pelo sequenciamento *paired-end* que foi executado pela plataforma MiSeq System® (Illumina), utilizando o MiSeq® Reagent Kit v3 para leituras de 300 pb.

### 3.8. Montagem e anotação do genoma

A avaliação das leituras geradas pelo sequenciamento genômico foi realizada pelo programa FastQC 11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>). Tendo como objetivo balancear as leituras, o programa Trimmomatic 0.39 (Bolger et al. 2014) foi utilizado. Através deste mesmo pacote, foi realizado ainda um filtro de qualidade dos arquivos para a montagem, onde bases com valores abaixo de PHRED 20 foram removidas.

A montagem do genoma se deu através de dois software distintos: SPAdes 3.13 (Bankevich et al. 2012) e Velvet 1.2.10 (Zerbino 2010), ambos utilizam a abordagem *de novo* para a construção dos *contigs*. Após a obtenção dos arquivos, as montagens foram avaliadas e comparadas pela plataforma web QUAST (Gurevich et al. 2013), sendo consideradas apenas sequências com tamanho superior a 500 pb.

O programa Geneious Prime 2019.2.1 (<http://www.geneious.com/>) foi responsável por gerar o *scaffold* e fechar os *gaps*. A cepa *C. pseudotuberculosis* PA01 (CP013327) foi utilizada como genoma de referência para esta análise. Após a sua reconstrução total, o genoma teve suas CDS preditas pelo programa RAST (Overbeek et al. 2014), e o mapa genômico foi construído pelo CGview Server (Grant & Stothard 2008). A anotação funcional definitiva das CDS foi executada no ambiente do *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP), do *National Center of Biotechnology Information* - NCBI e disponibilizado no GenBank.

### 3.9. Cultivo e diferenciação de THP-1

Os monócitos THP-1 (ATCC® TIB-202™) foram obtidos a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivados em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino – SFB (Gibco), 2 mM de glutamato, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão através da coloração por azul de Tripan a 0,4 %.

Após a quantificação, os frascos de cultura foram mantidos através da substituição do meio estabelecido por centrifugação e ressuspensão em  $2 \times 10^5$  a  $4 \times 10^5$  células viáveis por mL. A criopreservação foi feita em diferentes períodos de cultivo através da adição de 95% SFB e 5% sulfóxido de dimetilo (DMSO) e das alíquotas de células e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  para análises subsequentes.

A diferenciação dos monócitos seguiu o protocolo estabelecido por nosso grupo de pesquisa (Silva, 2019), utilizando 100 ng/mL de PMA por 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a ativação dos macrófagos, o meio de cultivo foi removido e as células aderentes foram lavadas com tampão fosfato salino – PBS 1x pH 7.2 (Gibco). Por meio da observação em microscópio óptico invertido, a diferenciação foi avaliada de acordo com a capacidade de adesão e morfologia celular.

### 3.10. Infecção *in vitro*

A cultura de macrófagos, em triplicata, foi infectada por *C. pseudotuberculosis* PA09 em placas de cultivo a uma densidade de  $4 \times 10^6$  células por frasco. A densidade óptica a comprimento de onda de 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) de 0.3, foi determinada como a concentração ótima de células bacterianas para uma taxa de multiplicidade de infecção (MOI) 1:5 macrófagos/bactérias, que ocorreu por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após o tempo determinado, o sobrenadante celular foi removido e os frascos de cultivo lavados com PBS 1x pH 7.2 (Gibco) e mantidos em cultivo por mais 24 horas.

### 3.11. Preparação da biblioteca e sequenciamento de RNA

Para a extração do RNA, as células foram removidas mecanicamente dos frascos de cultivo, centrifugadas a 2000 xg por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e submetidas ao protocolo do PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher), seguindo as orientações do fornecedor. A qualidade do RNA eluído foi avaliada pela concentração de material e pelo número de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA integrity number*), através do kit RNA ScreenTape Assay no equipamento 4200 TapeStation System (Agilent Technologies).

A conversão para cDNA e construção da biblioteca foi realizada seguindo o protocolo do SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep System (Agilent Technologies), segundo as orientações do fabricante e o sequenciamento dos transcritos ocorreu na plataforma NextSeq 550 System (Illumina), utilizando o NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5. Para o grupo controle, as células foram mantidas sob a mesma densidade em meio de cultivo RPMI-1640, suplementado com 10% SFB e passaram pelas mesmas etapas realizadas na preparação das amostras de infecção *in vitro*. Os sequenciamentos foram executados em triplicata.

### 3.12. Análise dos dados de transcriptoma

A qualidade das leituras brutas do sequenciamento foi visualizada pelo FastQC 0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e posteriormente, adaptadores e bases de baixa qualidade foram removidos através do Trimomatic 0.38 (Bolger et al. 2014), seguindo os parâmetros: NexteraPE-PE.fa:2:30:10:8:true SLIDINGWINDOW:4:25 MINLEN:60 TRAILING:3 LEADING:3.

Os leituras pareadas – R1 e R2 – correspondentes a cada réplica foram mapeadas contra o genoma de referência *Homo sapiens* GRCh38 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/>) pelo HISAT2 (Kim et al. 2015). Os arquivos em formato .BAM foram submetidos ao protocolo do StringTie 2.1.7 (Kovaka et al. 2019), para a montagem dos transcritos e estimativa dos níveis de expressão gênica.

A ferramenta *stringtie-merge*, realizou a compilação das montagens para a obtenção de um conjunto de dados unificado em todas as réplicas e subsequentemente, a geração de um arquivo com o número de leituras para cada gene, seguindo os parâmetros *default* do *pipeline*.



Os dados de expressão gênica diferencial foram gerados pelo programa edgeR 3.34.0 (Robinson et al. 2009), o qual utiliza o *Likelihood Ratio Test* para a performance da análise, utilizando as triplicatas dos contrastes de interesse: Infectado (INF) e Controle (CTR). A significância da análise diferencial foi dada pelo *p-value* ajustado pelo método *False Discovery Rate* (FDR)  $>0.05$ , e pela razão *log2 fold change* (logFC) (Quackenbush, 2002), onde, foram considerados induzidos perante a infecção por *C. pseudotuberculosis*, genes com  $\logFC \geq 1$  e genes reprimidos  $\logFC \leq -1$  em relação à condição controle. Além disso, através desta ferramenta foram gerados gráficos adicionais de similaridade entre amostras e distribuição dos genes expressos.

### 3.13. Análise de enriquecimento funcional

Uma lista de genes que apresentaram maiores valores de expressão diferencial foi utilizada para o enriquecimento funcional através da análise de processos biológicos da base de dados Gene Ontology (GO) na plataforma online g:Profiler (Raudvere et al. 2019). Para isto, foi feito uso da ferramenta g:GOST, utilizando informações do genoma de *Homo sapiens* com *threshold* de 0.05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Prospecção e identificação de *C. pseudotuberculosis*

Para este estudo, foram identificados três carneiros com diagnóstico clínico de LC em um rebanho de uma propriedade privada no Estado do Pará. Os materiais caseosos – amostras identificadas provisoriamente como OI1, OI2 e OI3 – foram obtidos através de punção dos abscessos caseosos (Figura 6).



Figura 6. Abscesso localizado em linfonodo submandibular de um carneiro com suspeita clínica de LC.

Os materiais obtidos dos abscessos foram submetidos à diluição seriada e plaqueados em diferentes meios de cultivo para a avaliação microbiológica. Nesta etapa, foram considerados principalmente o tempo de crescimento, o padrão de  $\beta$ -hemólise e morfologia das colônias (Figura 7).

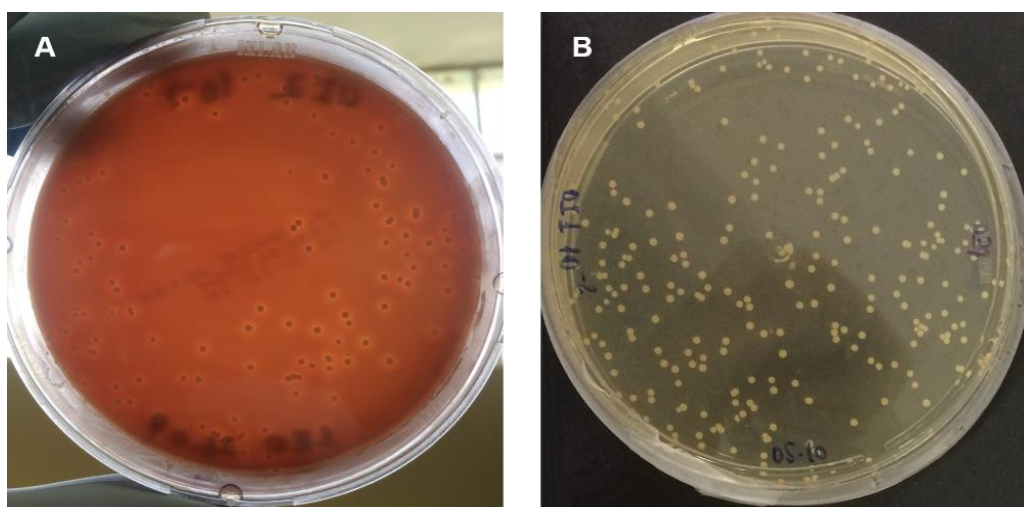


Figura 7. Placas de cultivo de *C. pseudotuberculosis* em (A) ágar sangue de carneiro e (B) ágar BHI.

Após atenderem os critérios pré-definidos nos procedimentos iniciais de cultivo, duas amostras (OI1 e OI3) foram submetidas à análise morfotintorial pelo método de Gram, onde foi possível analisar a morfologia de cocobacilos característica da espécie e coloração violeta, indicando que as cepas são Gram-positivas (Figura 8).

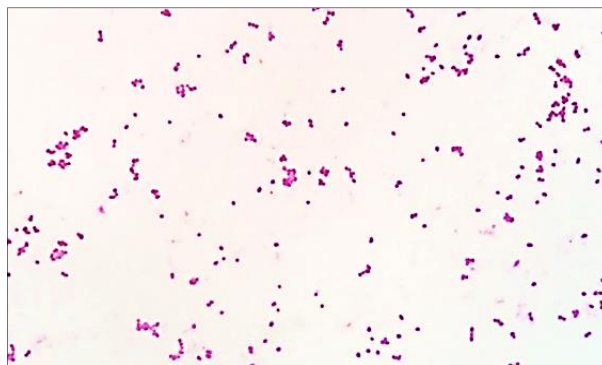


Figura 8. Análise morfotintorial por *C. pseudotuberculosis*, visualizada em microscópio óptico em aumento de 100x.

Desta forma, após a seleção inicial os isolados bacterianos tiveram seu material genético extraído para a realização do ensaio molecular, através da técnica de PCR. Na Figura 9, é possível identificar que ambas as cepas analisadas são representantes do biovar *ovis* quando comparados com os controles positivos, levando em consideração a amplificação das bandas dos genes *rrs*, *rpoB* e *pld* e ausência do amplicon do *narG*.

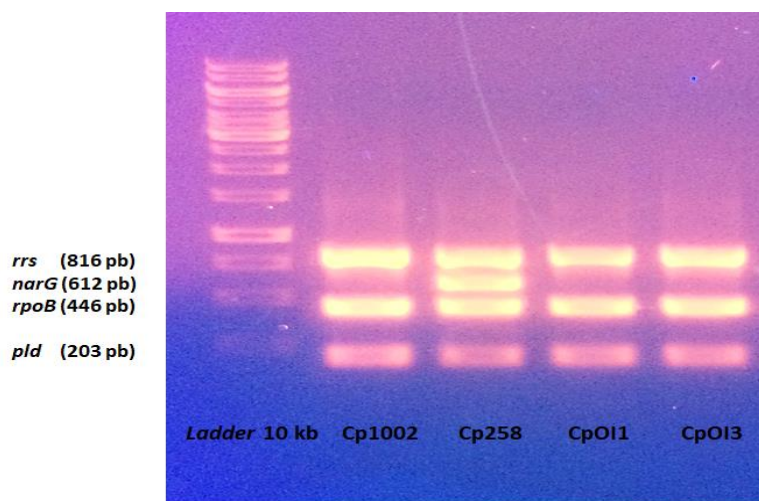


Figura 9. Visualização do gel de agarose dos produtos da PCR quadruplex das cepas OI1 e OI3.

Além disto, foi utilizada uma técnica adicional para a confirmação definitiva da espécie, baseada MALDI-TOF MS. Através do padrão espectros das amostras de interesse e das que estão disponíveis no servidor do equipamento, é realizada uma comparação que fornece os resultados em uma escala de pontuação que varia de 0 a 3. Para ambas as amostras submetidas, os valores permaneceram acima de 2.3, o que significa alta confiabilidade na identificação de espécie (Apêndice 3).

A amostra OI3 – a partir deste momento renomeada como *C. pseudotuberculosis* PA09 – foi selecionada como a cepa modelo para as análises de genômica bacteriana, infecção *in vitro* e transcriptômica.

#### 4.2. Genoma de *C. pseudotuberculosis* PA09

As leituras brutas geradas pelo sequenciamento genômico de *C. pseudotuberculosis* PA09 foram analisadas quanto a sua qualidade (Figura 8 A e B) pelo visualizador FastQC, sendo possível notar uma elevada média de qualidade e um decréscimo nas porções finais.

Desta forma, através do pacote Trimomatic, foi realizado o balanceamento dos arquivos R1 e R2, referentes à biblioteca pareada utilizada para o sequenciamento, bem como a remoção de leituras com qualidade Phred abaixo de 20 (Figura 10 C e D), melhorando significativamente a média para a realização da montagem.

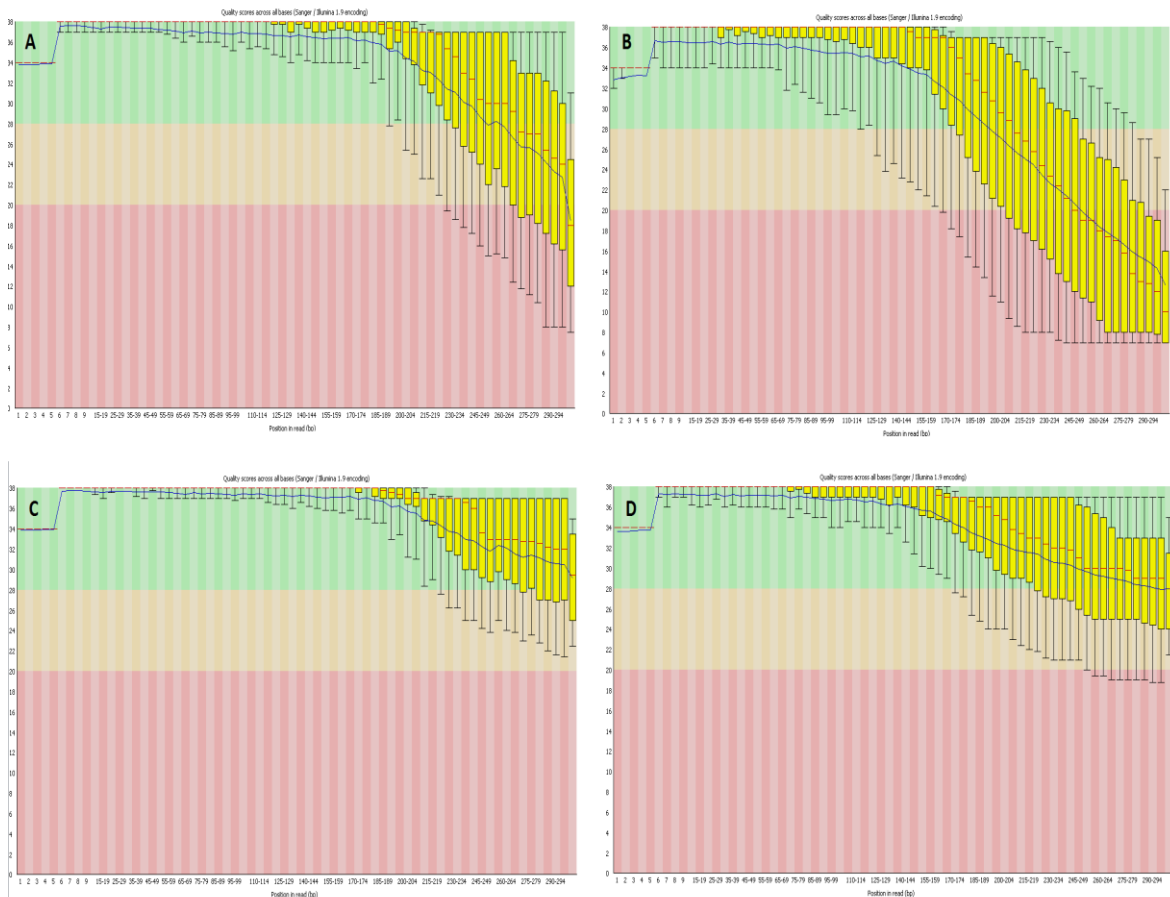


Figura 10. Análise de qualidade do genoma de *C. pseudotuberculosis* PA09 gerados (A e B - R1 e R2, respectivamente) no sequenciamento e (C e D - R1 e R2, respectivamente) após a aplicação do filtro de qualidade.

A etapa seguinte consistiu na montagem do genoma da bactéria, por meio de dois diferentes softwares – SPAdes e Velvet –, a fim de definir a melhor estratégia, baseada em algumas métricas de qualidade, como N<sub>50</sub>, tamanho e número de contigs. A montagem do genoma é avaliada quanto à sua qualidade através do tamanho e precisão dos contigs e scaffolds, geralmente baseados em medidas como os comprimento máximos e mínimos, tamanho total e N<sub>50</sub>.

O  $N_{50}$  é uma métrica calculada através da ordenação dos contigs com base no tamanho dos mesmos, do maior para o menor. Em seguida, a partir do maior contig, os demais são somados até que esta soma parcial se torne metade do comprimento total de todos os contigs na montagem, sendo  $N_{50}$  o tamanho do menor contig nesta lista. Portanto, presume-se que quanto maior o valor de  $N_{50}$ , melhor é a montagem do genoma (Yandell & Ence, 2012). Através da plataforma web QCAST, as duas montagens foram comparadas, mostrando que os melhores resultados foram gerados pelo SPAdes (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado da montagem do genoma de *C. pseudotuberculosis* PA09 pelos programas SPAdes e Velvet

	<b>SPAdes</b>	<b>Velvet</b>
<b>Nº de contigs total</b>	15	3312
<b>Nº de contigs <math>\geq</math> 500 pb</b>	11	1394
<b>Maior contig (pb)</b>	543127	8489
<b>Tamanho total (pb)</b>	2322885	2417450
<b>N50</b>	363805	1798
<b>G+C (%)</b>	52.18	52.16

Os 11 contigs gerados pelo SPAdes foram então submetidos ao programa Geneious para a geração do scaffold. Em toda a extensão do genoma, foram identificados três gaps em regiões de agrupamentos de rRNAs, que foram alinhados contra dos dados brutos, levando a 100% de representação do genoma.

Posteriormente, o arquivo em formato .FASTA foi enviado à plataforma web RAST para a predição de CDS, totalizando 2.221 genes distribuídos em 2.337.900 pb (Figura 11), sendo estes resultados compatíveis com as médias de genoma e quantidade de CDS em outras cepas da espécie já depositadas na base de dados.

O genoma da cepa foi então, disponibilizado na base de dados Genbank do NCBI e pode ser consultado sob número de acesso CP054555.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP054555.1>).

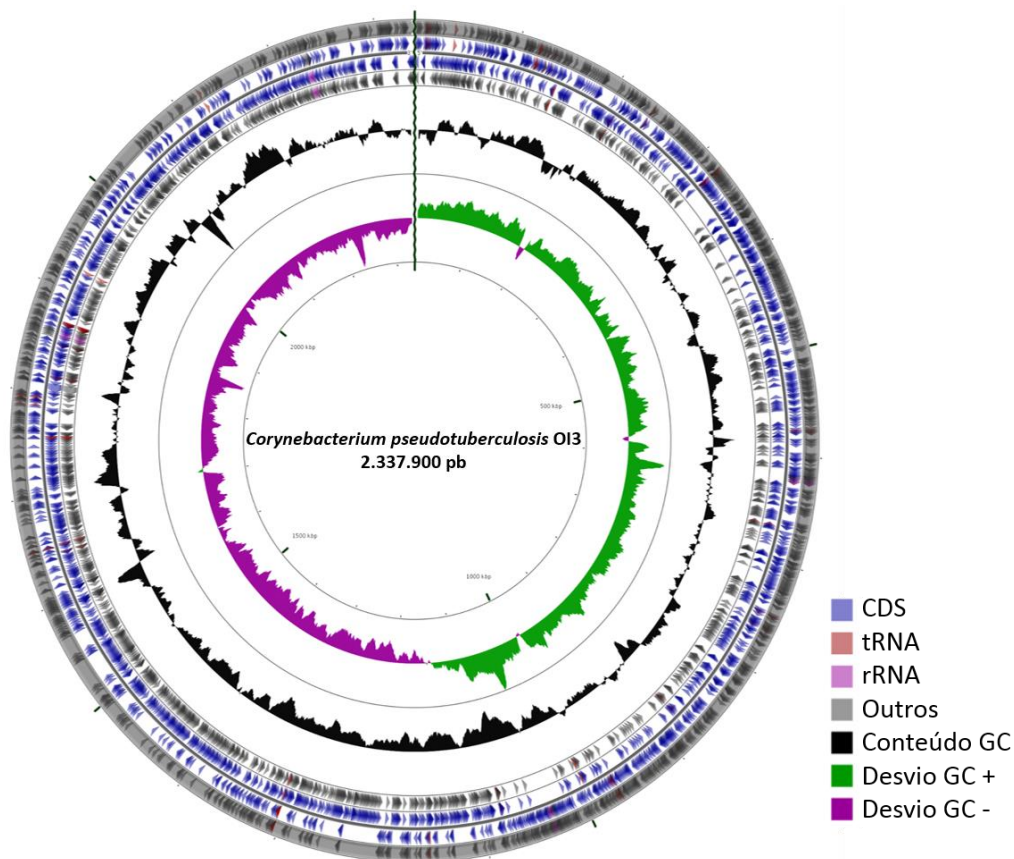


Figura 11. Mapa genômico de *C. pseudotuberculosis* PA09

#### 4.3. Curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* PA09

Com o objetivo de conhecer a dinâmica de crescimento da cepa modelo para o ensaio de infecção *in vitro*, foi realizada a construção da curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* PA09, onde, a fase exponencial iniciou cerca de 12 horas após o inóculo e perdurou até a vigésima hora. Apesar de um ritmo de replicação bacteriana mais lento, a fase estacionária começou de fato após 30 horas e o declínio a partir de 51 horas.

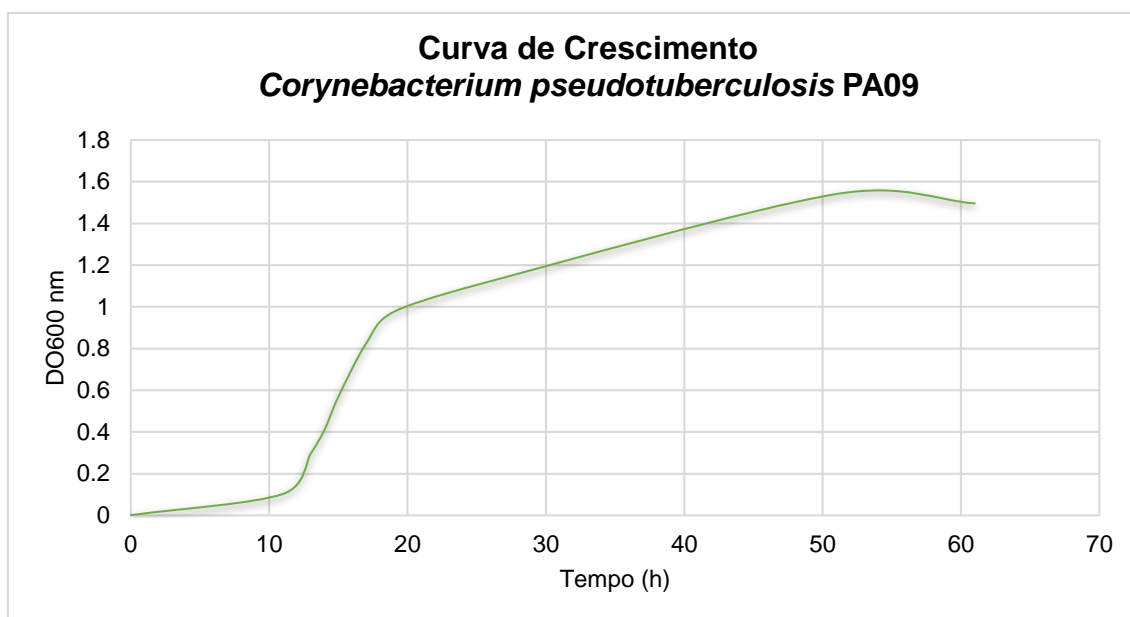


Figura 12. Curva de crescimento de *C. pseudotuberculosis* PA09.

Tendo como base os dados da curva a  $DO_{600\text{ nm}} = 0.3$ , atingida após cerca de 13 horas de cultivo (Tabela 3), foi definida como o ponto ideal para a retirada de inóculo bacteriano para a infecção *in vitro* em THP-1 por dois principais fatores: a quantidade suficiente de células para o MOI definido e o fato de se encontrar na fase exponencial de crescimento, o que indica que o microrganismo está metabolicamente mais ativo.

Tabela 3. Densidade de células bacterianas por tempo de cultivo

Tempo (Horas)	DO <sub>600 nm</sub>	Células bacterianas/mL
0	0.001	
11	0.103	$7.95 \times 10^7$
13	0.296	$1.14 \times 10^8$
14	0.411	$3.30 \times 10^8$
15	0.569	$1.08 \times 10^9$
17	0.824	$2.24 \times 10^9$
19	0.976	
25	1.105	
51	1.541	
61	1.496	



#### 4.4. Diferenciação de THP-1 e infecção *in vitro*

Definidos os parâmetros de cultivo de *C. pseudotuberculosis* PA09 para o ensaio de expressão gênica, as etapas posteriores se concentraram na preparação dos monócitos THP-1. Um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa realizou a padronização das condições ideais de concentração (10, 50 e 100 ng/mL) e tempo (24, 48 e 72 horas) de tratamento de PMA para a diferenciação em macrófagos, onde foi determinada a concentração de 100 ng/mL por 72 horas (Silva, 2019).

O presente estudo adotou o mesmo protocolo e alcançou resultados semelhantes de diferenciação da linhagem monocítica, baseados na observação na modificação do perfil fenotípico do cultivo antes da adição de PMA (Figura 13A), onde as células possuíam morfologia arredondada e permaneciam em suspensão no meio.

Após o tratamento com o agente de diferenciação, foi possível observar que as células em sua maioria adquiriram formato mais alongado, com projeções citoplasmáticas e formação de monocamada aderente ao frasco (Figura 13B).

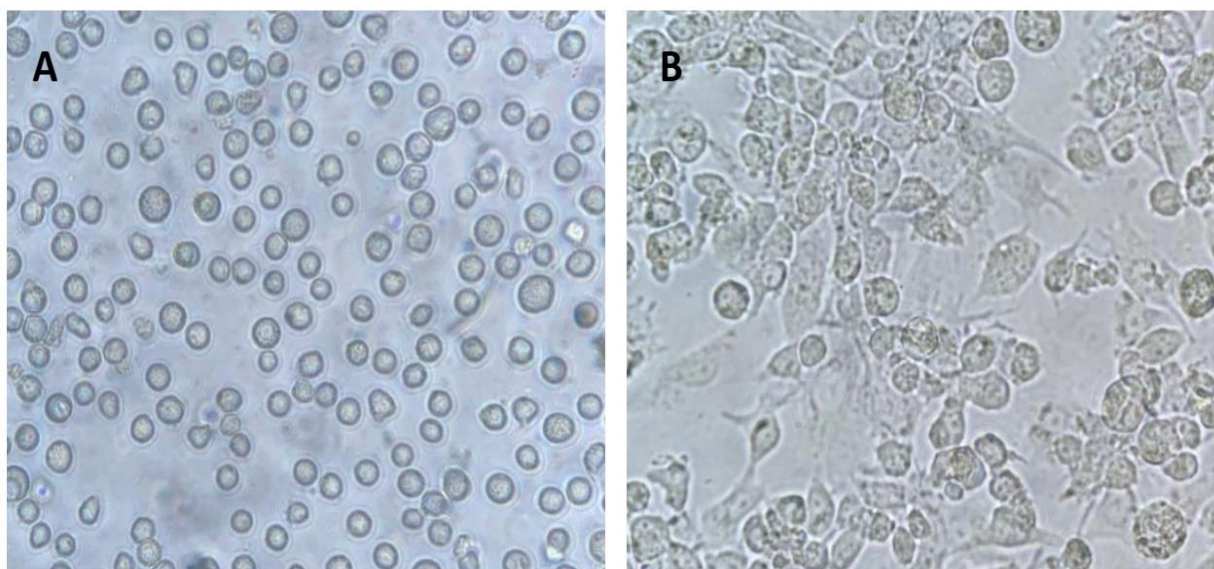


Figura 13. Micrografia de microscópio óptico invertido em lente de aumento de 30x das células THP-1 como (A) monócitos não diferenciados e (B) macrófagos diferenciados após o tratamento com PMA.

As réplicas da cultura de macrófagos a uma densidade de  $4 \times 10^6$  células por mL foram infectadas por *C. pseudotuberculosis* PA09 ( $2 \times 10^7$  bactérias/mL) durante 3 horas, tendo o meio trocado para a remoção de bactérias não fagocitadas. Posteriormente, a mistura de infecção e seus respectivos controles foram submetidos à extração do RNA total e avaliadas quanto à qualidade do material obtido através da concentração e do índice RIN (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de qualidade da extração de RNA total

Amostra	RIN	28S/18S	Concentração (ng/μL)
Ladder	N/A	N/A	84.9
INF1	9.3	3.0	431.0
INF2	9.3	3.2	380.0
INF3	9.1	1.8	680.0
CTR1	9.4	1.8	402.0
CTR2	9.5	2.7	384.0
CTR3	9.4	1.4	386.0

Foi possível observar nesta análise que o material obtido apresentou excelente qualidade baseado no perfil de bandas (Figura 14). O RIN estabelece uma escala de 1 a 10 (Schroeder et al. 2006), onde amostras próximas a 10 têm menor taxa de fragmentação, sendo mais adequadas para a construção de bibliotecas de sequenciamento de cDNA. Neste estudo, todas as amostras utilizadas apresentaram RIN > 9, indicando a eficiência do protocolo de extração utilizado.

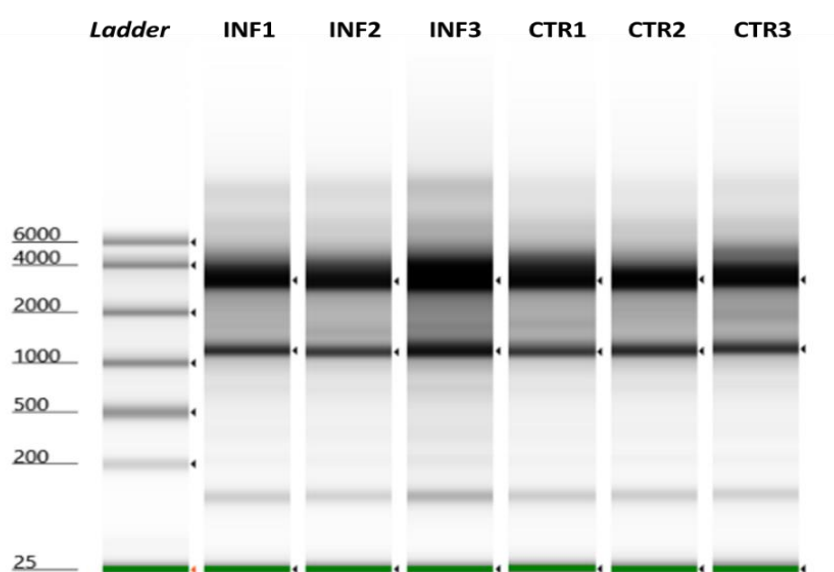


Figura 14. Análise do controle de qualidade do RNA através de eletroforese automatizada.

#### 4.5. Processamento dos dados de transcriptoma

Assim como nas análises do sequenciamento do genoma bacteriano, os dados gerados pelo RNA-Seq também tiveram sua qualidade avaliada pelo programa FastQC. Apesar de as leituras brutas em sua totalidade apresentarem boa qualidade foi decidido fazer uso do Trimomatic para remover bases de baixa qualidade nas porções finais das *reads* – característica comum do sequenciamento das plataformas de sequenciamento Illumina – de modo a otimizar os resultados das etapas subsequentes. Para isto, foi definida a remoção de bases com qualidade Phred abaixo de 30, o que implica na precisão de 99.9% do sequenciamento (1 erro a cada 1000).

O FastQC fornece gráficos de qualidade individuais para as extremidades direta e reversa da biblioteca de sequenciamento, e por este motivo, foram gerados no total 24 imagens contendo os pares de cada réplica antes e após o tratamento no Trimomatic. Devido a homogeneidade da qualidade dos resultados, os quais apresentaram perfis similares, optou-se por exibir nesta seção apenas as réplicas INF1 (Figura 15) e CTR1 (Figura 16) como representativas do total de amostras analisadas.

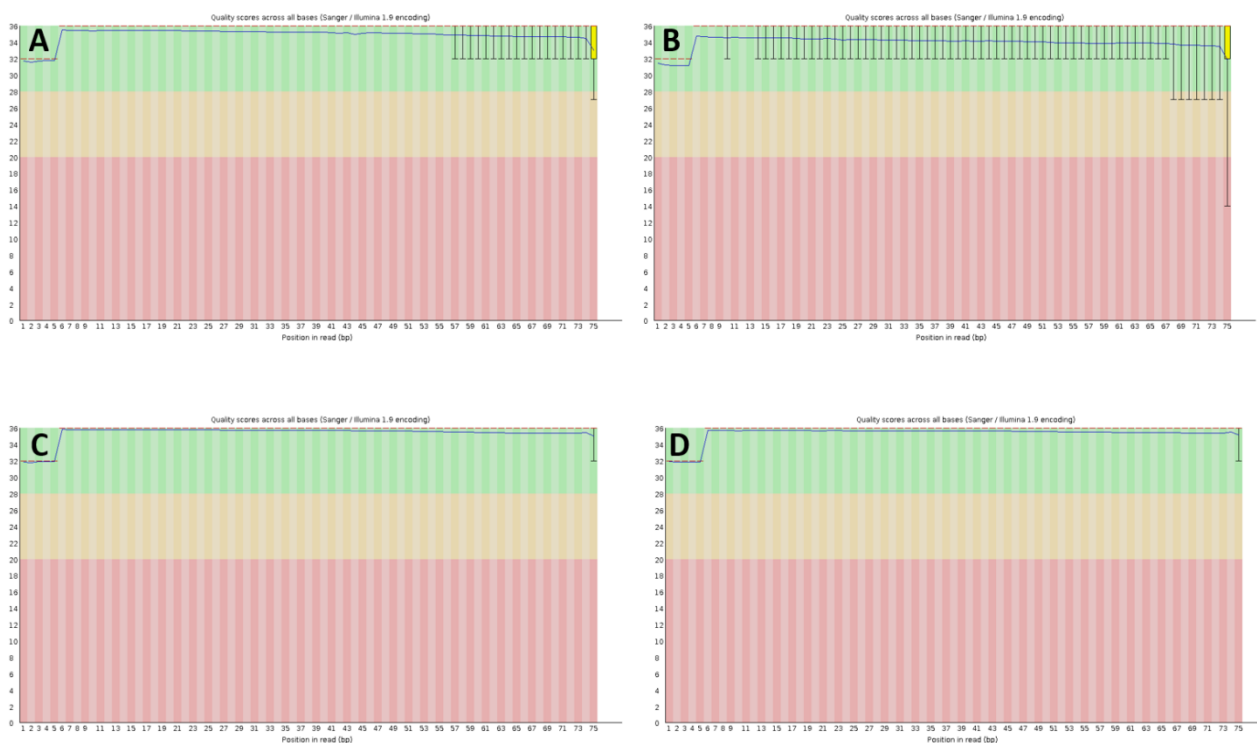


Figura 15. Análise de qualidade das leituras do sequenciamento de THP-1 perante a infecção *in vitro* antes (A e B) e após (C e D) o filtro de qualidade.

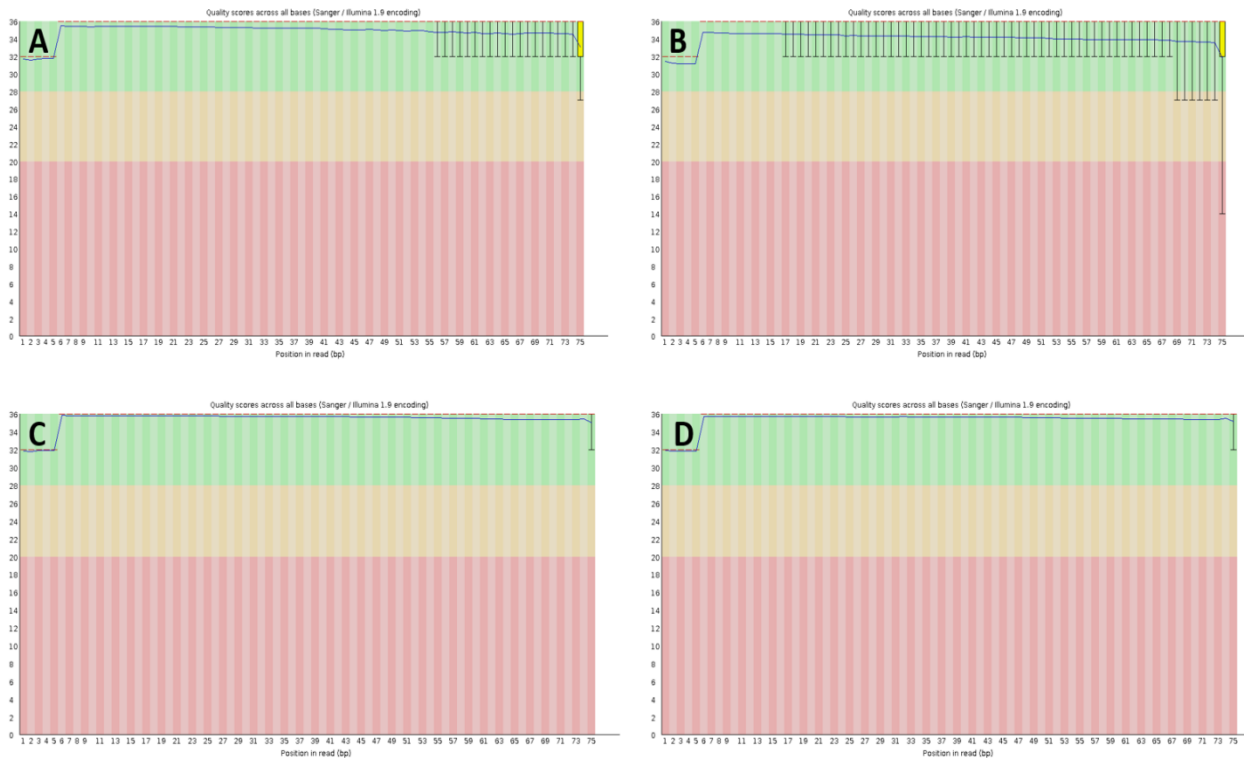


Figura 16. Análise de controle de qualidade das leituras do sequenciamento de THP-1 na condição controle antes (A e B) e após (C e D) o filtro de qualidade.

#### 4.6. Análise do perfil de expressão gênica

A partir dos dados oriundos do mapeamento contra o genoma de referência GRCh38, foram gerados arquivos de contagem para cada uma das réplicas. De modo a visualizar o nível de similaridade e a correlação entre as amostras, foi realizada uma análise de escalonamento multidimensional (MDS) pelo pacote edgeR.

No contexto de RNA-Seq, o gráfico MDS mostra a variação entre as amostras de modo que, quanto maior a distância entre as amostras, maior é sua dissimilaridade. Portanto, amostras pertencentes à mesma condição ou tratamento devem estar mais próximas umas das outras e distantes de outras condições.

A análise gráfica mostrada na Figura 17 evidencia a similaridade dos grupos controle e infectado, com base nos dois primeiros componentes principais da matriz de covariância de expressão gênica entre os indivíduos.

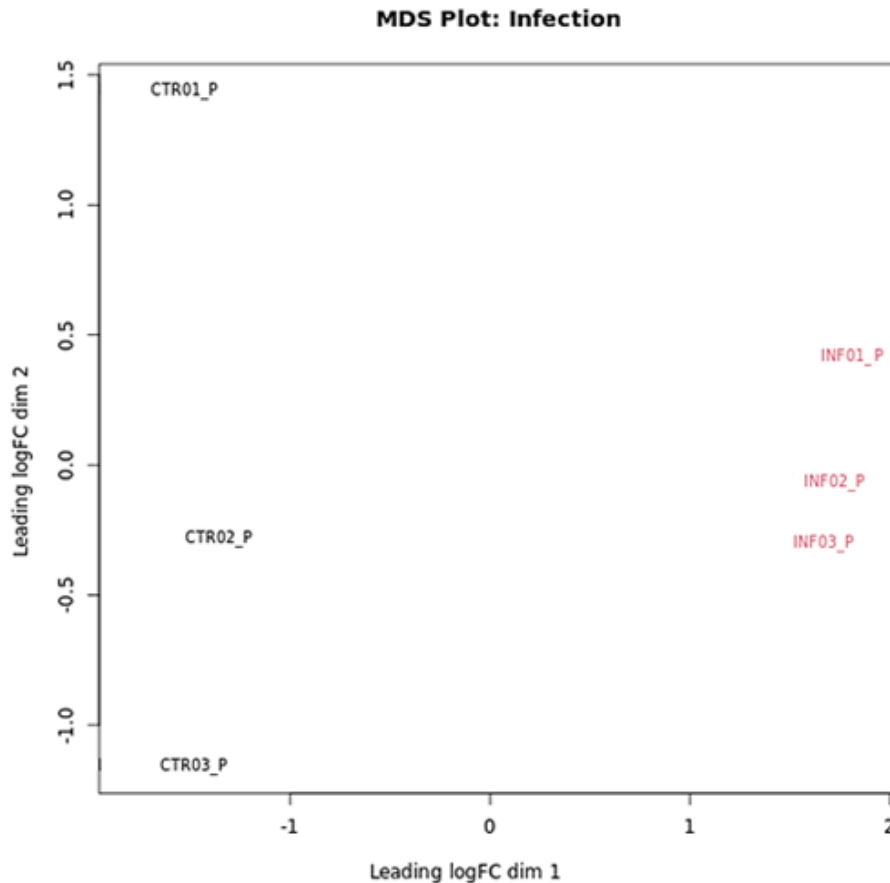


Figura 17. Gráfico MDS apontando as diferenças entre as amostras dos grupos experimentais.

De acordo com os parâmetros de *cut-off* estabelecidos, os resultados gerados pelo edgeR apontaram que 2892 genes humanos foram diferencialmente expressos. Deste quantitativo, 1213 foram induzidos e 1679 foram reprimidos em relação aos controles.

O perfil de expressão das condições experimentais pode ser explorado com mais detalhes através de gráficos de diferença média – MD, onde é possível analisar o logFC ajustado ao tamanho da biblioteca em relação à média expressão das amostras. Na figura a seguir é possível observar esta distribuição, onde o intervalo de valores de logFC variou de 8.79 a -9.69.

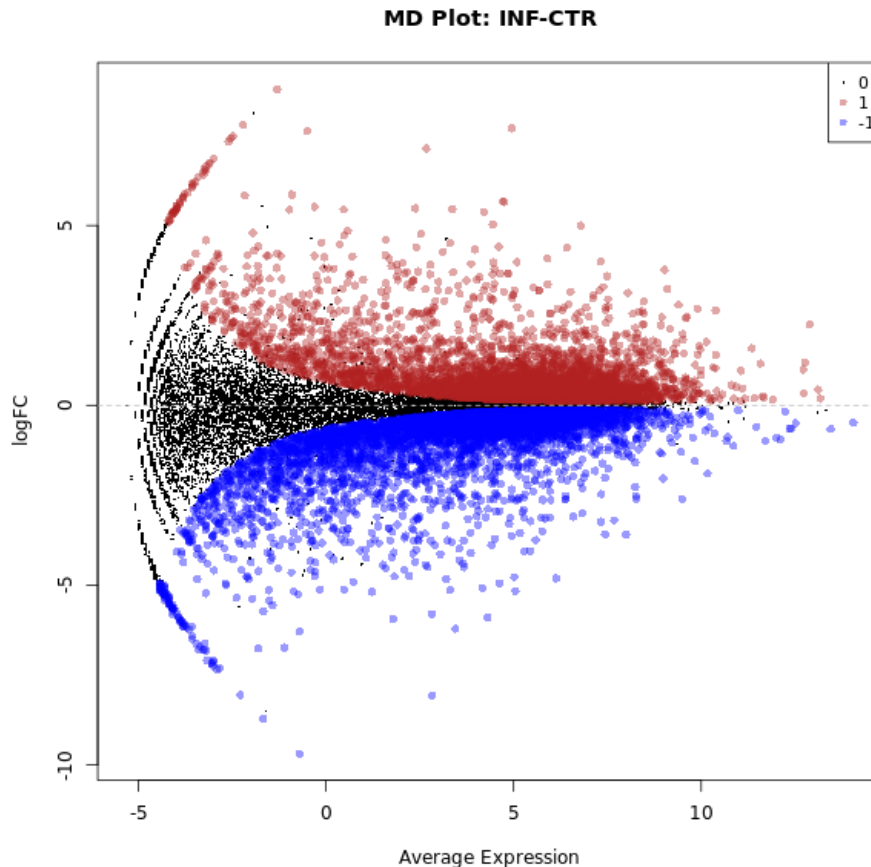


Figura 18. Gráfico de distribuição dos genes diferencialmente expressos. Os genes induzidos são representados em vermelho e os reprimidos em azul.

Subsequente à definição da quantidade de genes que foram hiper e hiporregulados, foi realizada a categorização destes alvos em ordem decrescente para a identificação daqueles que apresentaram maiores e menores valores de logFC. Devido a quantidade de genes obtidos nos resultados, as informações a seguir compilam a lista dos 40 principais genes induzidos (Tabela 5) e reprimidos (Tabela 6).

Entretanto, é válido ressaltar que apesar de não se tratarem dos genes com maiores ou menores níveis de expressão, de acordo com os dados de análise de enriquecimento, diversos transcritos merecem especial atenção por que tiveram funções preditas relacionadas à atividade no sistema imune e combate a infecções, e portanto, alguns deles serão discutidos nas sessões posteriores.

Tabela 5. Lista dos genes induzidos com maiores valores de logFC

<b>Gene</b>	<b>Produto</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>
CSAG3	CSAG family member 3	8.79	2.63E-18
FOLH1	folate hydrolase 1	7.79	2.46E-09
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	7.70	1.86E-173
KCNJ10	potassium inwardly rectifying channel subfamily J	7.62	2.85E-29
CLEC4D	C-type lectin domain family 4 member D	7.48	1.81E-07
MAJIN	membrane anchored junction protein	7.43	3.20E-07
CLEC6A	C-type lectin domain containing 6A	7.34	7.09E-07
ADGRF5	adhesion G protein-coupled receptor F5	7.14	2.58E-114
TEX50	testis expressed 50	6.86	4.14E-05
CHRNA1	cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit	6.75	9.65E-05
FCGR3B	Fc fragment of IgG receptor IIIb	6.71	1.24E-04
HPN	Hepsin	6.63	2.31E-04
GPR31	G protein-coupled receptor 31	6.58	3.74E-04
VNN2	vanin 2	6.52	3.19E-04
SIGLEC12	sialic acid binding Ig like lectin 12	6.49	4.35E-04
DISC1-IT1	DISC1 intronic transcript 1	6.41	5.76E-04
TMEM14EP	transmembrane protein 14E, pseudogene	6.35	1.16E-03
CEACAM3	CEA cell adhesion molecule 3	6.21	1.95E-03
FUT6	fucosyltransferase 6	6.13	3.39E-03
SH2D7	SH2 domain containing 7	6.09	3.62E-03
GUCY2D	guanylate cyclase 2D, retinal	6.06	3.83E-03
F10	coagulation factor X	5.92	6.70E-03
LUM	Lumican	5.86	9.11E-03
IDO2	indoleamine 2,3-dioxygenase 2	5.86	3.50E-20
MUC5AC	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	5.83	2.14E-08
TSPYL6	TSPY like 6	5.81	1.18E-02
KRT36	keratin 36	5.79	1.00E-02
AKR1C8P	aldo-keto reductase family 1 member C8	5.74	1.10E-02
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13	5.67	5.09E-157
CCL8	C-C motif chemokine ligand 8	5.65	4.88E-07
PPIAP30	peptidylprolyl isomerase A pseudogene 30	5.57	1.63E-02
TBC1D3G	TBC1 domain family member 3G	5.55	2.00E-02
PTGDR	prostaglandin D2 receptor	5.54	1.96E-02
ANO3	anoctamin 3	5.52	1.61E-09
PTGES	prostaglandin E synthase	5.47	4.49E-93
CFH	complement factor H	5.46	2.19E-130
CASR	calcium sensing receptor	5.45	2.19E-02
SELENBP1	selenium binding protein 1	5.44	2.25E-02
IL12B	interleukin 12B	5.43	5.09E-42
PTCHD4	patched domain containing 4	5.43	3.39E-18

Tabela 6. Lista dos genes reprimidos com menores valores de logFC

<b>Gene</b>	<b>Produto</b>	<b>logFC</b>	<b>FDR</b>
OR7E47P	olfactory receptor family 7 subfamily E member 47	-9.69	1.56E-31
OCSTAMP	osteoclast stimulatory transmembrane protein	-8.07	7.82E-125
CCDC182	coiled-coil domain containing 182	-8.05	1.18E-10
SERPINB12	serpin family B member 12	-7.35	9.54E-07
TREH	Trehalase	-7.31	7.81E-07
LIN28B	lin-28 homolog B	-7.25	3.63E-06
ZNF804B	zinc finger protein 804B	-7.19	4.96E-06
KCNIP1	potassium voltage-gated channel interacting 1	-7.16	5.48E-06
LINC02273	long intergenic non-protein coding RNA 2273	-7.15	3.67E-06
SOST	Sclerostin	-7.10	5.19E-06
DECR2	2,4-dienoyl-CoA reductase 2	-7.09	2.36E-04
TMEM125	transmembrane protein 125	-6.83	4.01E-05
INHBA-AS1	INHBA antisense RNA 1	-6.80	1.31E-04
TEX11	testis expressed 11	-6.78	6.28E-05
GRM4	glutamate metabotropic receptor 4	-6.76	8.27E-14
SCML4	Scm polycomb group protein like 4	-6.74	9.28E-22
CHRM1	cholinergic receptor muscarinic 1	-6.71	1.38E-04
KRT15	keratin 15	-6.62	2.90E-04
POMZP3	POM121 and ZP3 fusion	-6.62	2.28E-03
EIF4E1B	eukaryotic translation initiation factor 4E family 1B	-6.50	6.48E-04
ZNF385B	zinc finger protein 385B	-6.41	8.13E-04
RIMS1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	-6.29	4.53E-27
VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1	-6.21	8.98E-145
CNN1	calponin 1	-6.17	2.13E-03
TDRD9	tudor domain containing 9	-6.16	2.58E-03
DNAI1	dynein axonemal intermediate chain 1	-6.08	3.07E-03
DMGDH	dimethylglycine dehydrogenase	-6.01	4.05E-03
CPZ	carboxypeptidase Z	-6.00	3.83E-03
IYD	iodotyrosine deiodinase	-5.97	4.48E-03
GABRA4	gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha4	-5.93	4.13E-82
LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	-5.90	2.37E-176
VIPR1-AS1	VIPR1 antisense RNA 1	-5.89	5.55E-03
SATL1	spermidine/spermine N1-acetyl transferase like 1	-5.88	5.62E-03
XIRP1	xin actin binding repeat containing 1	-5.80	4.51E-116
SOD3	superoxide dismutase 3	-5.78	7.30E-03
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	-5.72	8.33E-14
MSANTD5	Myb/SANT DNA binding domain containing 5	-5.66	1.01E-02
SLITRK1	SLIT and NTRK like family member 1	-5.65	1.07E-02
IL13RA2	interleukin 13 receptor subunit alpha 2	-5.65	1.09E-02



A relação dos principais genes expressos neste estudo foi submetida à plataforma g:Profiler de modo analisar com maior riqueza de detalhes suas características funcionais (Figura 19). Neste contexto, um foco especial foi dado à subcategoria “processos biológicos”, definidos como conjuntos de eventos moleculares com início e final definidos, pertinentes à fisiologia das células, e o componente celular, onde estão discriminadas as partes de uma célula ou de seu ambiente extracelular (Carbon et al. 2019).

Além dos termos GO, a plataforma também é capaz de fornecer informações cruzadas com outros bancos de dados, onde foi possível relacionar os genes anotados com suas respectivas funções, vias metabólicas, domínios, motivos e famílias proteicas. Nesta análise funcional, os principais termos GO encontrados são relacionados a funções regulatórias, dentre elas: processos biológicos, processos metabólicos, resposta à estímulos, regulação do sistema imune, processos biológicos envolvidos em interação inter-espécies, dentre outros. Estes achados apontam para a importância dos genes analisados quanto à sua relevância no processo infeccioso.



Figura 19. Análise funcional dos alvos com maiores e menores valores de expressão diferencial.

## 5. DISCUSSÃO

A capacidade que patógenos bacterianos possuem de modificar as respostas do hospedeiro a nível transcricional e imunológico é um aspecto essencial para a compreensão dos eventos que levam à persistência de diversas doenças. Por esta razão, estudos que investigam alterações no transcriptoma destes hospedeiros no curso do processo infeccioso podem fornecer perspectivas sobre a modulação da resposta imune e os mecanismos de escape e persistência destes microrganismos (Curto et al. 2019).

Tomando como base esta ideia, o presente trabalho teve como principal objetivo realizar a análise do transcriptoma de células THP-1 mediante infecção *in vitro* por *C. pseudotuberculosis*, de modo a investigar quais dos genes diferencialmente expressos – sejam eles hipo ou hiper-regulados – possam ter relação com mecanismos de defesa primária contra este patógeno. Para isto, foi adotada uma variedade de metodologias que abrangem conhecimentos em microbiologia, biologia celular, biologia molecular e bioinformática para inferir a maneira na qual ocorre o comportamento a nível transcricional do macrófago após os eventos que sucedem a fagocitose.

Diversos estudos têm se concentrado em avaliar a patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* por diferentes pontos de vista, especialmente aqueles que abrangem abordagens multi-ômicas, o que forneceu dados sem precedentes sobre suas vias de ação e o conseqüente sucesso na persistência das infecções em diferentes espécies de interesse veterinário, bem como em humanos (Dorella et al. 2013). Devido a prevalência da bactéria no Estado do Pará, a primeira etapa deste trabalho se concentrou em realizar a prospecção de amostras a partir lesões em ovelhas com suspeita clínica de LC, onde, posteriormente foi confirmada a infecção bacteriana através de análises microbiológicas e moleculares.

Apesar de serem um excelente indicativo para a identificação de espécies bacterianas, métodos microbiológicos de maneira isolada podem ser subjetivos e passíveis à erros, e por este motivo foi feito uso da técnica de PCR quadruplex, proposta por Almeida et al., (2017), onde iniciadores específicos de genes importantes para a espécie são amplificados, sendo ainda possível determinar a qual dos dois biovars de *C. pseudotuberculosis* as cepas pertencem, de acordo com a amplificação do gene *narG*, exclusivo do genoma de representantes do biovar *equi*. Como esperado, a ausência do *amplicon* para este gene foi capaz de confirmar o material obtido era referente à cepas do biovar *ovis*. A combinação de diferentes métodos para a identificação da espécie também foi adotada por Guerrero e colaboradores (2018) no México e por Nassar e colaboradores (2016) no Brasil.

Ainda no que tange as análises iniciais, foi realizado o sequenciamento do genoma da cepa PA09, anexada à coleção bacteriana do CGBS – UFPA. A última década tem presenciado um aumento significativo da quantidade de genomas de *C. pseudotuberculosis* na base de dados GenBank NCBI, desde o primeiro, referente à cepa FRC11, obtido de um paciente diagnosticado com linfadenite necrosante (Trost et al. 2010), até o momento, contando com 124 genomas completos e 12 rascunhos. A publicação e divulgação dessas sequências fornece informações relevantes para estudos de elementos estruturais que contribuem para a virulência do microrganismo, contudo, as respostas do hospedeiro perante a infecção necessitam de mais estudos.

Portanto, a segunda etapa da pesquisa se direcionou à preparação dos monócitos THP-1 e seu posterior protocolo de diferenciação em macrófagos para a infecção. Esta linhagem tem se mostrado um bom modelo de estudo para macrófagos derivados de monócitos diferenciados *in vitro*, e é empregada em pesquisas de diferentes áreas, principalmente por ser constituída de uma população homogênea e mais estável quando comparada a monócitos humanos nativos, que por sua vez, tem taxa de proliferação limitada e maior susceptibilidade a variação de dados experimentais, sendo em geral, doador-dependentes (Bosshart & Heinzelmann, 2016).

Estudos indicam que tanto a concentração de PMA quanto o tempo de tratamento exercem influência na capacidade que macrófagos THP-1 têm de interagir com patógenos intracelulares. Na literatura é possível encontrar diferentes protocolos que utilizam condições variadas para diferenciar a linhagem, com concentrações de PMA que variam de 10 a 400 ng/mL e a duração do tratamento variando de 1 a 5 dias de estimulação (Kohro et al. 2004; Baxter et al. 2020). Em relação ao protocolo adotado para este trabalho foi verificado que tanto o tempo de administração quanto a concentração do agente indutor apresentaram os resultados estipulados, tendo em vista a observação da mudança do fenótipo das células antes e após o tratamento.

As células THP-1 são amplamente adotadas como modelo de infecção para a investigação de genes envolvidos na relação patógeno-hospedeiro. Recentemente, a comparação dos níveis de expressão de cepas de *M. tuberculosis* com diferentes níveis de virulência (H37Rv, H37Ra e BCG) foi avaliada por RNA-Seq, apontando uma diferença marcante entre os genes expressos de THP-1 aos três isolados. Na cepa virulenta H37Rv houve expressão aumentada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e indução elevada dos de piroptose em relação a cepa avirulenta H37Ra, destacando que o sistema imune pode responder de diferentes formas, dependendo do estímulo causado pelo patógeno (Pu et al. 2021).

Após a definição dos parâmetros de qualidade das leituras geradas pelo sequenciamento dos transcritos, os dados foram mapeados contra a versão mais recente do genoma humano a fim de se obter uma lista de genes que apresentaram expressão diferencial durante a infecção *in vitro* por *C. pseudotuberculosis*. Baseado nos resultados de enriquecimento funcional, alguns dos genes que tiveram categorias relacionadas à atividade no sistema imunológico serão discutidos com mais detalhes a seguir.

Dois alvos, CLEC4D e CLEC6A codificam integrantes da superfamília de proteínas *C-type lectin receptors* (CLR), comumente expressas em células mielóides, e tem a capacidade de reconhecer uma vasta gama de ligantes modulando ou ativando a função imune ao reconhecer PAMP e DAMP (padrões moleculares associados a danos), por intermédio de seu domínio de lectina (Dambuza & Brown 2015). As CLR são majoritariamente descritas pelo seu envolvimento na imunidade contra fungos, em especial *Cryptococcus neoformans*, mas seu papel em mecanismos de defesa contra parasitas, vírus e bactérias também já foram reportados (Drummond & Brown 2013; Kitai et al. 2021).

As ligações que ocorrem entre CLR e PAMP são capazes de induzir uma cascata de respostas, tais como a produção de citocinas e sinalização para a indução da resposta imune adaptativa. CLEC4D é predominantemente expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos, e já foi estudado por sua interação com micobactérias através da ligação com TDM, um glicopeptídeo presente na parede celular do patógeno que é capaz de regular positivamente a expressão de Mincle, um dos receptores presentes em macrófagos que são responsáveis pela ativação da fagocitose (Marakalala & Ndlovu 2017).

A interação CLEC4D-TDM é ainda apontada como um evento-sinal para o início da maturação em células T. Além disto, foi demonstrado que o *knockout* do CLR aumentou a susceptibilidade à infecção por *M. tuberculosis* em camundongos (Miyake et al. 2013; Miyake et al. 2015). Diante destas informações, pode-se inferir que a alta taxa de expressão nestes genes pode ser relacionada a um mecanismo de defesa similar das células THP-1 contra *C. pseudotuberculosis*.

Outro interessante produto que apresentou um alto valor de logFC foi a glicoproteína CEACAM3, conhecida por ser um dos sítios de ligação de patógenos em células hospedeiras (Muenzner et al. 2005). CEACAM3 é uma das proteínas que possui ação na fagocitose independente de opsoninas em diferentes espécies bacterianas, dentre elas *H. influenzae*, *H. pylori*, *N. meningitidis* e *M. catarrhalis* que possuem mecanismos de acoplamento aos fagócitos por meio de adesinas que se ligam de maneira específica a sua superfície (Schmitter et al. 2004).

Bonsignore e colaboradores (2020) apontam que esta proteína possui um motivo de ativação denominado de ITAM, o qual desempenha papel-chave na fagocitose de bactérias, dado que a mutação de resíduos de tirosina presentes no motivo ocasionou a diminuição da taxa de internalização dos patógenos através do bloqueio da fosforilação de CEACAM3. Este trabalho sugere que a fosforilação cria uma plataforma para moléculas efetoras induzirem a remodelação necessária para o citoesqueleto formar o cálice fagocitário.

Durante a infecção ocorre o metabolismo de diversos aminoácidos, e estes processos regulam a imunidade inata e adaptativa. Por este motivo, a função das bactérias no catabolismo de aminoácidos e na produção de metabólitos capazes de regular o desenvolvimento e a função do sistema imune inato vem sendo estudado. Sabe-se que em mamíferos o triptofano é degradado através da via da quinurenina, onde uma das etapas ocorre através da ação das indoleamina 2,3-dioxigenases 1 (logFC = 7.70) e 2 (log FC = 5.85) (Zelante et al. 2009).

IDO1 apresentou um dos maiores valores de logFC na análise de expressão diferencial, e seu produto é envolvido com a privação de triptofano no meio e a produção de quinurenina, responsável por ativar o regulador Ahr, é essencial na interface patógeno-hospedeiro (Moffett & Namboodiri 2003). Neste sentido, a compreensão das vias que regulam as funções de IDO1 dão margem para novas estratégias da atividade imunorreguladora, controle farmacológico, bem como a modulação da atividade catalítica desta enzima e se mostra uma abordagem terapêutica em potencial para a modulação a resposta imune em diferentes estágios (Tomé, 2021).

Membros das duas principais subfamílias conhecidas de quimiocinas – CXC e CC – foram induzidos nas análises. As quimiocinas compõem um grande grupo de citocinas de baixo peso molecular que tem a habilidade de mediar a migração de células do sistema imune. São moléculas que possuem atividades pró-inflamatórias induzidas durante a resposta imunológica no sítio de infecção e também têm efeito homeostático devido a capacidade de atuar no desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos (Zlotnik & Yoshie 2012).

Dentre todas as quimiocinas investigadas, CXCL13 e CCL8 foram as que obtiveram os maiores e mais similares valores de logFC. A primeira é expressa por macrófagos e sua produção é requerida para o correto funcionamento da resposta humoral mediada por linfócitos B-1, ao passo que já foi previamente demonstrado que CCL8 apresenta elevados índices de expressão em macrófagos derivados de THP-1 e RAW264.7 infectados por micobactérias (Ansel et al. 2002; Liu et al. 2013).

Condições patológicas que envolvem o sistema imunológico podem ser afetadas pela concentração de selênio no indivíduo, influenciada por fatores como os níveis de ingestão, a conversão de compostos em metabólitos e características genéticas que podem afetar o uso deste metabólito (Avery & Hoffmann 2018). *Selenium-binding protein 1* (SELENBP1) está envolvida no processo de autofagia de macrófagos murinos infectados por *S. aureus*, têm papel na modulação da transcrição das vias de sinalização MAPK e NF- $\kappa$ B e inibição do crescimento patógeno intracelularmente (Zang et al. 2020). Devido ao elevado nível de transcrição nos resultados, pode executar função semelhante na modulação da resposta de macrófagos a *C. pseudotuberculosis*.

Diversas interleucinas, dentre elas IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-32 e IL-33, também foram hiper-expressas, reforçando a importância desta classe de moléculas na modulação da resposta imune do hospedeiro. Estas citocinas são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos, e medeiam o desencadeamento de uma resposta imune efetiva, ligando componentes das imunidades inata e adaptativa, através da modificação do microambiente do macrófago (Duque & Descoteaux 2014).



Microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos adaptativos para sobreviver a resposta imune e até usá-la em seu próprio benefício, e a regulação positiva ou negativa da produção e liberação de citocinas de macrófagos tem efeitos profundos nesta resposta. Dada a importância da produção destas moléculas na modulação da resposta, vários fatores de virulência dos agentes infecciosos têm as interleucinas como alvo principal (Flannagan et al. 2009).

Neste sentido, não é surpreendente inferir que apesar de serem constantemente expressas como sinal de combate à infecção, algumas citocinas sofrem exatamente o efeito contrário e têm sua ação suprimida pela modulação da resposta bacteriana. A IL-24 atua como reguladora imunológica na indução de citocinas Th1. A administração de IL-24 exerceu um efeito protetor contra a infecção por *S. typhimurium* em camundongos através da estimulação da produção precoce das citocinas Th1, IFN- $\gamma$  e IL-12 por neutrófilos, que por sua vez ativam células T CD8 + (Ma et al. 2009). Tendo como base os resultados obtidos (logFC = -5.14), sugere-se que *C. pseudotuberculosis* pode ser capaz de inibir a expressão de IL-24, bloqueando deste modo a cascata de resposta protetiva do macrófago.

A enzima superóxido dismutase 3, codificada pelo gene SOD3, catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio. Além da síntese e liberação dessa proteína extracelular pela via secretora, estudos mostraram que SOD3 também se localiza em compartimentos intracelulares de macrófagos, modificando as condições redox no espaço extracelular e desempenha um papel importante na fase inicial da ativação do macrófago e na resposta inflamatória (Hu et al. 2019).

O reconhecimento das bactérias pelos macrófagos leva à produção de ERO nos compartimentos celulares, onde cumprem diferentes funções antibacterianas por meio do estresse oxidativo gerado por superóxido dismutases e NADPH oxidase 2 (NOX2). Algumas bactérias intracelulares, como *M. tuberculosis* inibem ativamente o recrutamento de enzimas oxidativas para os fagossomos, limitando a produção de ERO e mantendo a viabilidade no interior dos macrófagos, alertando para o uso de um mecanismo similar em corinebactérias (Herb & Schramm 2021).

Duas catepsinas (G e W) também foram reprimidas e fazem parte de um grupo de proteases que contribuem diretamente para a morte de patógenos ou indiretamente, por seu envolvimento nas vias de apresentação de antígenos. A baixa expressão de CTSG em macrófagos neste estudo é suportada por resultados semelhantes descritos por Rivera-Marrero et al, (2004). A infecção dos macrófagos por *M. tuberculosis* levou a uma diminuição da produção desta enzima e maior sobrevivência da bactéria, entretanto, os mecanismos de regulação do patógeno necessitam de mais evidências experimentais para serem esclarecidos.

## 6. CONCLUSÃO

- Por meio deste estudo, foi possível sequenciar e montar uma nova cepa de *C. pseudotuberculosis* isolado no Estado do Pará, o qual foi ainda utilizado como modelo de estudo da interação patógeno-hospedeiro;
- O protocolo de diferenciação da linhagem monocítica THP-1 através do tratamento com 100 ng/mL de PMA demonstrou a eficiência esperada para sua utilização no ensaio de infecção *in vitro*;
- Através das condições estabelecidas para o cultivo celular, infecção *in vitro* e extração de ácidos nucleicos foi possível a obtenção de RNA de alta qualidade para o sequenciamento dos transcritos;
- RNA-Seq gerou leituras com excelentes parâmetros de qualidade, otimizando desta forma, os resultados de expressão gênica subsequentes;
- A análise de expressão diferencial mostrou que 1213 genes do macrófago THP-1 foram induzidos e 1679 reprimidos durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- As principais categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos estão ligadas principalmente a processos metabólicos, resposta à estímulos, regulação do sistema imune e processos biológicos envolvidos em interação inter-espécies;
- Este trabalho contribui para a melhor compreensão dos eventos ocorridos durante o contato inicial entre *C. pseudotuberculosis* e seus hospedeiros, abrindo possibilidade para o desenvolvimento de análises mais específicas dos mecanismos de modulação da resposta imune contra o patógeno, bem como o planejamento de estratégias mais efetivas para a minimização dos prejuízos causados por ele.

## 7. REFERÊNCIAS

Abebe D and 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. *Lett Appl Microbiol* 61:469–476. doi: 10.1111/lam.12482

Aderem A and Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593–623. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.593

Al-Gaabary MH, Osman SA and Oreiby AF (2009) Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Rumin Res* 87:116–121. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.10.008

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B and Normark S (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261:511–528. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01821.x

Almeida S, Dorneles EMS, Diniz C, Abreu V, Sousa C, Alves J, Carneiro A, Bagano P, Spier S, Barh D et al. (2017) Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Vet Res* 13:290. doi: 10.1186/s12917-017-1210-5

Alves JTC, Veras AAO, Cavalcante ALQ, de Sá PHCG, Dias LM, Guimarães LC, Morais E, Silva AGM, Azevedo V, Ramos RTJ et al. (2016) Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain PA01, Isolated from Sheep in Pará, Brazil. *Genome Announc* 4:15–16. doi: 10.1128/genomeA.01664-15.Copyright

Ansel KM, Harris RBS, Cyster JG, Francisco S and Hall D (2002) CXCL13 Is Required for B1 Cell Homing, Natural Antibody Production, and Body Cavity Immunity. *J Exp Med* 194:67–76.

Araújo CL, Alves J, Nogueira W, Pereira LC, Gomide AC, Ramos R, Azevedo V, Silva A and Folador A (2019) Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene* 702:36–45. doi: 10.1016/j.gene.2019.03.049

Avery JC and Hoffmann PR (2018) Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients*. doi: 10.3390/nu10091203

Baird GJ and Fontaine MC (2007) *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J Comp Pathol* 137:179–210. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.07.002

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD et al. (2012) SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

Barakat AA, Selim SA, Atef A, Saber MS, Nafie EK and El-Ebeedy AA (1984) Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different animal species. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 3:151–163. doi: 10.20506/rst.3.1.147

Baxter EW, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JI, Mackie SL and Morgan AW (2020) Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. doi: 10.1016/j.jim.2019.112721

Benoit M, Desnues B and Mege J-L (2008) Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J Immunol* 181:3733–3739. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733

Billington SJ, Esmay PA, Songer JG and Jost BH (2002) Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 208:41–45. doi: 10.1016/S0378-1097(01)00573-0

Bobryshev Y V, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG and Orekhov AN (2016) Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. doi: 10.1155/2016/9582430

Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

Bonsignore P, Kuiper JWP, Adrian J, Goob G and Hauck CR (2020) CEACAM3—A Prim(at)e Invention for Opsonin-Independent Phagocytosis of Bacteria. *Front*

Immunol 10:1–11. doi: 10.3389/fimmu.2019.03160

Bosshart H and Heinzelmann M (2016) THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med* 4:438–438. doi: 10.21037/atm.2016.08.53

Bregenzer T, Frei R, Ohnacker H and Zimmerli W (1997) *C. pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clin Microbiol Infect* 3:696–698.

Burkovski A (2013a) Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol* 2013:935736. doi: 10.1155/2013/935736

Burkovski A (2013b) Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiol* 2013:1–11. doi: 10.1155/2013/935736

Carbon S, Douglass E, Dunn N, Good B, Harris NL, Lewis SE, Mungall CJ, Basu S, Chisholm RL, Dodson RJ et al. (2019) The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* 47:D330–D338. doi: 10.1093/nar/gky1055

Carmo FB, Guimarães AS, Pauletti RB, Lage AP, Gonçalves VSP, Meyer R, Portela RW, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AMG et al. (2012) Prevalência De Anticorpos Contra a Linfadenite Caseosa Em Criações Comerciais De Ovinos No Distrito Federal , Brasil. 79:293–296.

Casadevall A and Pirofski L (2001) Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *J Infect Dis* 184:337–344. doi: 10.1086/322044

Cendrowicz E, Sas Z, Bremer E and Rygiel TP (2021) The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy.

Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T and Vaneechoutte M (2002) Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88:75–83. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00089-5

Chandran A, Antony C, Jose L, Mundayoor S, Natarajan K and Ajay Kumar R (2015) Mycobacterium tuberculosis infection induces HDAC1-mediated suppression of IL-12B gene expression in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* 5:1–14. doi: 10.3389/fcimb.2015.00090

Chanput W, Mes JJ and Wichers HJ (2014) THP-1 cell line: An in vitro cell model

for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 23:37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002

Chirino-Zárraga C, Scaramelli A and Rey-Valeirón C (2006) Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Rumin Res* 65:170–175. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.06.017

Corrêa JI, Stocker A, Trindade SC, Vale V, Brito T, Bastos B, Raynal JT, de Miranda PM, de Alcantara AC, Freire SM et al. (2018) In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Express*. doi: 10.1186/s13568-018-0598-z

Costa WLO, Alves JTC, Dias LM, de Aragão Araújo CL, Morais E, Silva AGM, Andrade SS, Ramos RTJ, Silva A and Folador ARC (2017) Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* PA04, isolated from the lymph node of a sheep in the amazon, Brazil. *Genome Announc*. doi: 10.1128/genomeA.00202-17

Curto P, Riley SP, Simões I and Martinez JJ (2019) Macrophages infected by a pathogen and a non-pathogen spotted fever group rickettsia reveal differential reprogramming signatures early in infection. *Front Cell Infect Microbiol*. doi: 10.3389/fcimb.2019.00097

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB and Dockrell DH (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0008668

Dambuza IM and Brown GD (2015) C-type lectins in immunity: Recent developments. *Curr Opin Immunol* 32:21–27. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.002

Denis M (1991) Modulation of *Mycobacterium lepraemurium* growth in murine macrophages: Beneficial effect of tumor necrosis factor alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun* 59:705–707.

Dias AA de S de O, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS, Junior FCS, Napoleão F, Nagao PE, Villas-Bôas MHS, Junior RH and Guaraldi ALM (2011) *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: An emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saúde Publica* 45:1176–1191. doi: 10.1590/S0034-

89102011000600021

Dijk EL Van, Jaszczyszyn Y, Naquin D and Thermes C (2018) The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* doi: 10.1016/j.tig.2018.05.008

Dominguez Del Angel V, Hjerde E, Sterck L, Capella-Gutierrez S, Notredame C, Vinnere Pettersson O, Amselem J, Bouri L, Bocs S, Klopp C et al. (2018) Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. *F1000Research* 7:148. doi: 10.12688/f1000research.13598.1

Dorella FA, Carvalho Pacheco L, Oliveira SC, Miyoshi A and Azevedo V (2006a) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37:201–218. doi: 10.1051/vetres:2005056

Dorella FA, Carvalho Pacheco L, Oliveira SC, Miyoshi A and Azevedo V (2006b) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37:201–218. doi: 10.1051/vetres:2005056

Dorella FA, Gala-Garcia A, Pinto AC, Sarrouh B, Antunes CA, Ribeiro D, Aburjaile FF, Fiaux KK, Guimarães LC, Seyffert N et al. (2013) Progression of ‘Omics’ Methodologies for Understanding the Pathogenicity of *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: the Brazilian Experience. *Comput Struct Biotechnol J* 6:1–7. doi: 10.5936/csbj.201303013

Drummond RA and Brown GD (2013) Signalling C-Type Lectins in Antimicrobial Immunity. *PLoS Pathog* 9:9–11. doi: 10.1371/journal.ppat.1003417

Duque GA and Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *5:1–12.* doi: 10.3389/fimmu.2014.00491

Ellis JA, Hawk DA, Mills KW and Pratt DL (1991) Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet Immunol Immunopathol* 28:303–316. doi: 10.1016/0165-2427(91)90122-S

Ellis TM, Sutherland SS, Wilkinson FC, Mercy a R and Paton MW (1987) The



role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. *Aust Vet J* 64:261–263.

Epelman S, Lavine KJ and Randolph GJ (2014) Review Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41:21–35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013

Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M and Hinton JCD (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47:103–118. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x

Fabozzi G, Oler AJ, Liu P, Chen Y, Mindaye S, Dolan MA, Kenney H, Gucek M, Zhu J, Rabin RL et al. (2018) Strand-Specific Dual RNA Sequencing of Bronchial Epithelial Cells Infected with Influenza A/H3N2 Viruses Reveals Splicing of Gene Segment 6 and Novel Host-Virus Interactions. *J Virol*. doi: 10.1128/jvi.00518-18

Ferrer LM, Lacasta D, Chacón G, Ramos JJ, Villa A, Gómez P and Latre M V. (2009) Clinical diagnosis of visceral caseous lymphadenitis in a Salzwedder ewe. *Small Rumin Res* 87:126–127. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.10.011

Flannagan RS, Cosío G and Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. doi: 10.1038/nrmicro2128

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* (80-) 269:496–512. doi: 10.1126/science.7542800

Fontaine MC, Baird G, Connor KM, Rudge K, Sales J and Donachie W (2006) Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24:5986–5996. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.005

Fontaine MC and Baird GJ (2008) Caseous lymphadenitis. *Small Rumin Res* 76:42–48. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.12.025

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM et al. (1995) The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* (80-) 270:397–404. doi:

10.1126/science.270.5235.397

Freney J, Duperron MT, Courtier C, Hansen W, Allard F, Boeufgras JM, Monget D and Fleurette J (1991) Evaluation of API coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 29:38–41.

Funke G and Bernard KA (2011) Coryneform Gram-Positive Rods. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. pp 413–442

Gogulamudi VR, Dubey ML, Kaul D, Atluri VSR and Sehgal R (2015) Downregulation of host tryptophan-aspartate containing coat (TACO) gene restricts the entry and survival of *Leishmania donovani* in human macrophage model. *Front Microbiol* 6:1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00946

Gomide ACP, de Sá PG, Cavalcante ALQ, de Jesus Sousa T, Gomes LGR, Ramos RTJ, Azevedo V, Silva A and Folador ARC (2018a) Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi. *Gene* 645:124–130. doi: 10.1016/j.gene.2017.12.015

Gomide ACP, Ibraim IC, Alves JTC, de Sá PG, de Oliveira Silva YR, Santana MP, Silva WM, Folador EL, Mariano DCB, de Paula Castro TL et al. (2018b) Transcriptome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi in two conditions of the environmental stress. *Gene* 677:349–360. doi: 10.1016/j.gene.2018.08.028

Gordon S and Plüddemann A (2019) The mononuclear phagocytic system. Generation of diversity. *Front Immunol* 10:1–10. doi: 10.3389/fimmu.2019.01893

Grant JR and Stothard P (2008) The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* 36:181–184. doi: 10.1093/nar/gkn179

Guerrero JAV, de Oca Jiménez RM, Acosta Dibarrat J, León FH, Morales-Erasto V and Salazar HGM (2018) Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microb Pathog* 117:304–309. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.031

Guimarães AS, Seyffert N, Bastos BL, Portela RWD, Meyer R, Carmo FB, Cruz

JCM, McCulloch JA, Lage AP, Heinemann MB et al. (2009) Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Rumin Res* 87:86–91. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.09.027

Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N and Tesler G (2013) QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086

Hansmeier N, Chao TC, Daschkey S, Müsken M, Kalinowski J, Pühler A and Tauch A (2007) A comprehensive proteome map of the lipid-requiring nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411. *Proteomics* 7:1076–1096. doi: 10.1002/pmic.200600833

Hard GC (1972) Examination By Electron Microscopy Of The Interaction Between Peritoneal Phagocytes And *Corynebacterium Ovis*. *J Med Microbiol* 5:483–491.

Hariharan H, Tiwari KP, Kumthekar S and Thomas D (2015) Serological Detection of Caseous Lymphadenitis in Sheep and Goats Using a Commercial ELISA in Grenada , West Indies. doi: 10.5171/2015.473459

He W, Yuan T and Maedler K (2019) Macrophage-associated pro-inflammatory state in human islets from obese individuals. *Nutr Diabetes* 0–3. doi: 10.1038/s41387-019-0103-z

Herb M and Schramm M (2021) Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants* 10:40–45.

Hodgson ALM, Carter K, Tachedjian M, Krywult J, Corner LA, McColl M and Cameron A (1999) Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine* 17:802–808. doi: 10.1016/S0264-410X(98)00264-3

Hu L, Zachariae ED, Larsen UG, Vilhardt F and Petersen S V (2019) Redox Biology The dynamic uptake and release of SOD3 from intracellular stores in macrophages modulates the inflammatory response. *Redox Biol* 26:101268. doi: 10.1016/j.redox.2019.101268

Hu Z-D, Wei T-T, Tang Q-Q, Ma N, Wang L-L, Qin B-D, Yin J-R, Zhou L and Zhong R-Q (2016) Gene expression profile of THP-1 cells treated with heat-killed *Candida albicans*. *Ann Transl Med* 4:170–170. doi: 10.21037/atm.2016.05.03

Huang YK, Chen SY, Wong MY, Chiu CH and Chu C (2019) Pathogenicity differences of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Choleraesuis-specific virulence plasmids and clinical *S. Choleraesuis* strains with large plasmids to the human THP-1 cell death. *Microb Pathog* 128:69–74. doi: 10.1016/j.micpath.2018.12.035

Hume DA, Irvine KM and Pridans C (2019) The Mononuclear Phagocyte System : The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends Immunol* 40:98–112. doi: 10.1016/j.it.2018.11.007

IBGE IB de G e E (2020) Produção Agropecuária. In: Acesso em 13 mai 2022. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria>.

Ibraim IC, Teixeira M, Parise D, Parise D, Zibetti M, Sfeir T, Luiz T, Castro DP, Wattam AR, Ghosh P et al. (2019) Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. 1–24.

Judson R and Songer JG (1991) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet Microbiol* 27:145–150. doi: 10.1016/0378-1135(91)90005-Z

Kaba J, Kutschke L and Gerlach GF (2001) Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet Microbiol* 78:155–163. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00284-4

Kanampalliwar AM, Soni R, Girdha A and Tiwari A (2013) Reverse Vaccinology: Basics and Applications. *J Vaccines Vaccin* 04:1–5. doi: 10.4172/2157-7560.1000194

Kawai T and Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–384. doi: 10.1038/ni.1863

Kim D, Langmead B and Salzberg SL (2015) HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12:357–360. doi: 10.1038/nmeth.3317

Kitai Y, Sato K, Tanno D, Yuan X, Umeki A, Kasamatsu J, Kanno E, Tanno H, Hara H, Yamasaki S et al. (2021) Role of Dectin-2 in the Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by Dendritic Cells. *Infect Immun* 89:1–11. doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.00330-21>. Editor

Kittl S, Studer E, Brodard I, Thomann A and Jores J (2022) *Corynebacterium uberis* sp. nov. frequently isolated from bovine mastitis. *Syst Appl Microbiol* 45:126325. doi: 10.1016/j.syapm.2022.126325

Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S and Henriques-Normark B (2009) Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe* 5:580–592. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.011

Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T and Kodama T (2004) A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage. *J Atheroscler Thromb* 11:88–97. doi: 10.5551/jat.11.88

Kovaka S, Zimin A V., Pertea GM, Razaghi R, Salzberg SL and Pertea M (2019) Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biol* 20:1–13. doi: 10.1186/s13059-019-1910-1

Kovalchuk A, Zeng Z, Ghimire RP, Kivimäenpää M, Raffaello T, Liu M, Mukrimin M, Kasanen R, Sun H, Julkunen-Tiitto R et al. (2019) Dual RNA-seq analysis provides new insights into interactions between Norway spruce and necrotrophic pathogen *Heterobasidion annosum* s.l. *BMC Plant Biol* 19:1–17. doi: 10.1186/s12870-018-1602-0

Lee JY, Na YA, Kim E, Lee HS and Kim P (2016) The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. *J Microbiol Biotechnol* 26:807–822. doi: 10.4014/jmb.1601.01053

Liu H, Liu Z, Chen J, Chen L, He X, Zheng R, Yang H, Song P, Weng D, Hu H et al. (2013) Induction of CCL8 / MCP-2 by Mycobacteria through the Activation of TLR2 / PI3K / Akt Signaling Pathway. 8:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0056815

Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L and Law M (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. doi:

10.1155/2012/251364

Liu Q, Fan G, Wu K, Bai X, Yang X, Song W, Chen S, Xiong Y and Chen H (2022) Description of *Corynebacterium poyangense* sp. nov., isolated from the feces of the greater white-fronted geese (*Anser albifrons*). *J Microbiol* 60:668–677. doi: 10.1007/s12275-022-2089-9

Liu YC, Zou XB, Chai YF and Yao YM (2014) Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* 10:520–529. doi: 10.7150/ijbs.8879

Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S and Shafee T (2017) Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 13:1–23. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005457

Ma Y, Chen H, Wang Q, Luo F, Yan J and Zhang X (2009) IL-24 protects against *Salmonella typhimurium* infection by stimulating early neutrophil Th1 cytokine production, which in turn activates CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 39:3357–3368. doi: 10.1002/eji.200939678

Mangan DF, Welch GP and Wahl SM (1991) Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 146:1541–1546.

Marakalala MJ and Ndlovu H (2017) Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. *PLoS Pathog* 13:1–8. doi: 10.1371/journal.ppat.1006333

Marsh JW, Humphrys MS and Myers GSA (2017) A laboratory methodology for dual RNA-sequencing of bacteria and their host cells in vitro. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2017.01830

Mattos-Guaraldi AL, Duarte Formiga LC, Marques EA, Pereira GA, Moreira LO, Pimenta FP, Ferreira Camello TC and Oliveira EF (2001) Diphtheria in a vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol* 32:236–239. doi: 10.1590/S1517-83822001000300015

McKean SC, Davies JK and Moore RJ (2007) Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis* is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology* 153:2203–2211. doi: 10.1099/mic.0.2007/005926-0

McNamara PJ, Bradley GA and Songer JG (1994) Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 12:921–930.

Merrell DS, Butler SM, Qadri F, Dolganov NA, Alam A, Cohen MB, Calderwood SB, Schoolnik GK and Camilli A (2002) Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* 417:642–645. doi: 10.1038/nature00778

Merriman B, Torrent I and Rothberg JM (2012) Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 33:3397–3417. doi: 10.1002/elps.201200424

Miller JR, Koren S and Sutton G (2010) Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* 95:315–327. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.03.001

Miyake Y, Oh-hora M and Yamasaki S (2015) C-Type Lectin Receptor MCL Facilitates Mincle Expression and Signaling through Complex Formation. *J Immunol* 194:5366–5374. doi: 10.4049/jimmunol.1402429

Miyake Y, Toyonaga K, Mori D, Kakuta S, Hoshino Y, Oyamada A, Yamada H, Ono KI, Suyama M, Iwakura Y et al. (2013) C-type Lectin MCL Is an FcRγ-Coupled Receptor that Mediates the Adjuvanticity of Mycobacterial Cord Factor. *Immunity* 38:1050–1062. doi: 10.1016/j.immuni.2013.03.010

Moffett JR and Namboodiri MA (2003) Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 81:247–265. doi: 10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01177.x

Montoya DJ, Andrade P, Silva BJA, Teles RMB, Ma F, Bryson B, Sadanand S, Noel T, Lu J, Sarno E et al. (2019) Dual RNA-Seq of Human Leprosy Lesions Identifies Bacterial Determinants Linked to Host Immune Response. *Cell Rep* 26:3574-3585.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.109

Moore D and Dowhan D (2002) Preparation and Analysis of DNA. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley. New York, p Supplement 59

Morozova O and Marra MA (2008) Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92:255–264. doi: 10.1016/j.ygeno.2008.07.001

Moura-Costa LF De (2010) *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Rev Ciências Médicas e Biológicas* 1:105–115.

Muenzner P, Rohde M, Kneitz S and Hauck CR (2005) CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J Cell Biol* 170:825–836. doi: 10.1083/jcb.200412151

Muge GRS, Veras AAO, de Sá PHCG, Cavalcante ALQ, Alves JTC, Morais E, Silva AGM, Guimarães LC, Azevedo V, Folador ARC et al. (2016) Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain PA02 Isolated from an Ovine Host in the Amazon. *Genome Announc* 4:e00838-16. doi: 10.1128/genomeA.00838-16

Mukherjee P and Heitlinger E (2019) Dual RNA-Seq meta-analysis in *Plasmodium* infection. *bioRxiv* 576116. doi: 10.1101/576116

Murray P, Rosenthal K and Pfaller M (2013) *Medical microbiology*. Elsevier. doi: 9788480864657

Murray PJ (2017) Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* 79:541–566. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339

Nabih AM, Hussein HA, El-Wakeel SA, Abd El-Razik KA and Gomaa AM (2018) *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats. *Vet World* 11:1574–1580. doi: 10.14202/vetworld.2018.1574-1580

Nassar AF de C, Daniel GT, Ruiz R, Miyashiro S, Scannapieco EM, Souza Neto J de and Gregory L (2016) Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* 82:1–6. doi: 10.1590/1808-1657000692013

Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES and Young RA (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 99:1503–1508. doi: 10.1073/pnas.022649799

Oliveira A, Oliveira LC, Aburjaile F, Benevides L, Tiwari S, Jamal SB, Silva A, Figueiredo HCP, Ghosh P, Portela RW et al. (2017) Insight of genus



Corynebacterium: Ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.01937

Osman AY, Nordin ML, Kadir AA and Saharee AA (2018) The Epidemiology and Pathophysiology of Caseous Lymphadenitis: A Review. *J Vet Med Res* 5:1129.

Ott L (2018) Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiol* 4:85–103. doi: 10.3934/microbiol.2018.1.85

Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M et al. (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:206–214. doi: 10.1093/nar/gkt1226

Pacheco LG, Slade SE, Seyffert N, Santos AR, Castro TL, Silva WM, Santos A V., Santos SG, Farias LM, Carvalho MA et al. (2011) A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiol.* doi: 10.1186/1471-2180-11-12

Pacheco LGC, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MNL, Oliveira SC, Meyer R, Alves FSF et al. (2007) Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol* 56:480–486. doi: 10.1099/jmm.0.46997-0

Parise D, Parise MTD, Gomide ACP, Aburjaile FF, Kato RB, Salgado-Albarrán M, Tauch A, Azevedo VA de C and Baumbach J (2021) The transcriptional regulatory network of *corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microorganisms* 9:1–18. doi: 10.3390/microorganisms9020415

Paule BJA, Azevedo V, Regis LF, Carminati R, Bahia CR, Vale VLC, Moura-Costa LF, Freire SM, Nascimento I, Schaer R et al. (2003) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: Kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet Immunol Immunopathol* 96:129–139. doi: 10.1016/S0165-2427(03)00146-6

Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM and Kerr TG (1997) Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia

and review. *Clin Infect Dis* 24:185–191. doi: 10.1093/clinids/24.2.185

Pépin M, Pittet JC, Oliver M and Gohin I (1994) Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J Leukoc Biol* 56:666–670. doi: 10.1002/jlb.56.5.666

Piddington DL, Fang FC, Laessig T, Cooper AM, Orme IM and Buchmeier NA (2001) Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun* 69:4980–4987. doi: 10.1128/IAI.69.8.4980-4987.2001

Pinto A, de Sá PHCG, Ramos RTJ, Barbosa S, Barbosa HPM, Ribeiro A, Silva W, Rocha F, Santana M, de Paula Castro T et al. (2014a) Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics* 15:14. doi: 10.1186/1471-2164-15-14

Pinto AC, de Sá PHCG, Ramos RTJ, Barbosa S, Barbosa HPM, Ribeiro AC, Silva WM, Rocha FS, Santana MP, de Paula Castro TL et al. (2014b) Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics* 15:14. doi: 10.1186/1471-2164-15-14

Pinto AC, Ramos RTJ, Silva WM, Rocha FS, Barbosa S, Miyoshi A, Schneider MPC, Silva A and Azevedo V (2012) The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified using ab initio methodologies. *Integr Biol (Camb)* 4:789–94. doi: 10.1039/c2ib00092j

Pizarro-Cerdá J and Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715–727. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012

Pu W, Zhao C, Wazir J, Su Z, Niu M, Song S, Wei L, Li L, Zhang X, Shi X et al. (2021) Comparative transcriptomic analysis of THP-1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, H37Ra and BCG. *J Cell Mol Med* 25:10504–10520. doi: 10.1111/jcmm.16980

Pugh DG. and Baird. AN (2012) *Sheep and Goat Medicine*, 2th ed. Elsevier Inc., New York

Quackenbush J (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32:496–501. doi: 10.1038/ng1032

Rani B and Sharma VK (2017) Transcriptome profiling: methods and applications- A review. *Agric Rev* 38:271–281. doi: 10.18805/ag.R-1549

Rappuoli R (2001) Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19:2688–2691. doi: 10.1016/S0264-410X(00)00554-5

Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H and Vilo J (2019) G:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 47:W191–W198. doi: 10.1093/nar/gkz369

Reece ST and Kaufmann SHE (2012) Host defenses to intracellular bacteria, Fifth Edit. *Clin Immunol Princ Pract Fourth Ed.* doi: 10.1016/B978-0-7234-3691-1.00046-5

Rivera-Marrero CA, Stewart J, Shafer WM and Roman J (2004) The down-regulation of cathepsin G in THP-1 monocytes after infection with *Mycobacterium tuberculosis* is associated with increased intracellular survival of bacilli. *Infect Immun* 72:5712–5721. doi: 10.1128/IAI.72.10.5712-5721.2004

Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616

Rogers PD, Barker KS, Thornton J, Swiatlo E, McDaniel LS, McDaniel DO and Sacks GS (2003) Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 71:2087–2094. doi: 10.1128/IAI.71.4.2087-2094.2003

Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC, Santos AR, Rocha AAMC, Lopes DO, Dorella FA, Pacheco LGC et al. (2011) Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One* 6:e18551. doi: 10.1371/journal.pone.0018551

Samuel S, Safeera A, Ahmed G, Rudrapathy P, Murugesan S and Dinju (2019) Emergence of non-diphtheritic *Corynebacterium* as a co-pathogen in various clinical specimens in cancer patients. *Online J Heal Allied Sci* 18:1–4.

Santiago LB, Pinheiro RR, Alves FSF, Santos VWS dos, Rodrigues A de S, Lima AMC, Oliveira EL de and Albuquerque FHMAR de (2013) In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* 80:273–280. doi: 10.1590/s1808-16572013000300003

Santos AR, Carneiro A, Gala-García A, Pinto A, Barh D, Barbosa E, Aburjaile F, Dorella F, Rocha F, Guimarães L et al. (2012) The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. *BMC Genomics* 13 Suppl 5:S6. doi: 10.1186/1471-2164-13-S5-S6

Santos RM dos, Cerqueira SMA, Andrade CLB, Müller GS, Santos VC de M, Araújo HR de, Queiroz S, Conceição RR, Oliveira LGF, Ribeiro MB et al. (2022) Human Seroreactivity to Secreted Molecules of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Adv Microbiol* 12:150–158. doi: 10.4236/aim.2022.123012

Santos LM, Stanisic D, Menezes UJ, Mendonça MA, Barral TD, Seyffert N, Azevedo V, Durán N, Meyer R, Tasic L et al. (2019) Biogenic Silver Nanoparticles as a Post-surgical Treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Small Ruminants. *Front Microbiol* 10:1–11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00824

Schmitter T, Agerer F, Peterson L, Münzner P and Hauck CR (2004) Granulocyte CEACAM3 Is a Phagocytic Receptor of the Innate Immune System that Mediates Recognition and Elimination of Human-specific Pathogens *The Journal of Experimental Medicine*. doi: 10.1084/jem.20030204

Schröder J, Maus I, Trost E and Tauch A (2011) Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/1471-2164-12-545

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M and Ragg T (2006) The RIN : an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:1–14. doi: 10.1186/1471-2199-7-3

Schuster SC (2008) Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5:16–18. doi: 10.1038/nmeth1156

Schweppe DK, Harding C, Chavez JD, Wu X, Ramage E, Singh PK, Manoil C and Bruce JE (2015) Host-Microbe Protein Interactions during Bacterial Infection. *Chem Biol* 22:1521–1530. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.09.015

Selim SA, Mohamed FH, Hessain AM and Moussa IM (2016) Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Saudi J Biol Sci* 23:282–287. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.11.004

Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F, Fournier PE, Drancourt M, Scola B La and Raoult D (2013) Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: Impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:2182–2194. doi: 10.1128/JCM.00492-13

Seyffert N, Guimarães AS, Pacheco LGC, Portela RW, Bastos BL, Dorella FA, Heinemann MB, Lage AP, Gouveia AMG, Meyer R et al. (2010) High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Res Vet Sci* 88:50–55. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.07.002

Sharma CM and Vogel J (2014) Differential RNA-seq: The approach behind and the biological insight gained. *Curr Opin Microbiol* 19:97–105. doi: 10.1016/j.mib.2014.06.010

Silva MT de O, Bezerra FSB, de Pinho RB, Begnini KR, Seixas FK, Collares T, Portela RD, Azevedo V, Dellagostin O and Borsuk S (2018) Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine* 36:74–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.029

Silva PN (2019) Caracterização de exossomas secretados por macrófagos derivados de THP-1 em infecção in vitro por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará.

Simmons CP, Hodgson ALM and Strugnell RA (1997) Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun*

65:3048–3056.

Singathia R, Mishra R, Yadav R, Gangil R, Dutta P and Lakhotia RL (2011) Therapeutic management of ulcerative lymphangitis in a mare. 50:103–104.

Soares SC, Trost E, Ramos RTJ, Carneiro AR, Santos AR, Pinto AC, Barbosa E, Aburjaile F, Ali A, Diniz CAA et al. (2013) Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. J Biotechnol 167:135–141. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.11.003

Souza MDF, Carvalho AQ De and Jr FG (2011) Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba 1. Pesqui Vet Bras 31:224–230.

Spier SJ, Toth B, Edman J, Quave a., Habasha F, Garrick M and Byrne B a. (2012) Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi in soil. Vet Rec 170:180–180. doi: 10.1136/vr.100543

Steinman A, Elad D and Shpigel NY (1999) Ulcerative lymphangitis and coronet lesions in an Israeli dairy herd infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet Rec 145:604–606.

Subedi R, Kolodkina V, Sutcliffe IC, Simpson-Louredo L, Hirata R, Titov L, Mattos-Guaraldi AL, Burkovski A and Sangal V (2018) Genomic analyses reveal two distinct lineages of *Corynebacterium ulcerans* strains. New Microbes New Infect 25:7–13. doi: 10.1016/j.nmni.2018.05.005

Tauch A and Burkovski A (2015) Molecular armory or niche factors: Virulence determinants of *Corynebacterium* species. FEMS Microbiol Lett 362:1–6. doi: 10.1093/femsle/fnv185

Tauch A, Trost E, Tilker A, Ludewig U, Schneiker S, Goesmann A, Arnold W, Bekel T, Brinkrolf K, Brune I et al. (2008) The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. J Biotechnol 136:11–21. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.02.009

Tomé D (2021) Amino acid metabolism and signalling pathways : potential targets in the control of infection and immunity. Eur J Clin Nutr 1319–1327. doi:

10.1038/s41430-021-00943-0

Ton-That H and Schneewind O (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* 50:1429–1438. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03782.x

Trost E, Ott L, Schneider J, Schröder J, Jaenicke S, Goesmann A, Husemann P, Stoye J, Dorella FA, Rocha FS et al. (2010) The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene- regulatory networks contributing to virulence. doi: 10.1186/1471-2164-11-728

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T and Tada K (1982) Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42:1530–1536.

Tsuchiya S, Yamaguchi Y and Kobayashi Y (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 176:171–176.

Varol C, Mildner A and Jung S (2015) Macrophages: Development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* (80- ) 291:1304–1351. doi: 10.1126/science.1058040

Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI and Charette SJ (2017) Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods* 138:60–71. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.016

Walker J, Jackson H, Brandon MR and Meeusen E (1991) Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clin Exp Immunol* 86:13–18. doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb05766.x

Wang Z, Gerstein M and Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63. doi: 10.1038/nrg2484

Westermann AJ, Gorski SA and Vogel J (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol* 10:618–630. doi: 10.1038/nrmicro2852

Williamson LH (2001) Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17:359–371. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30033-5

Wittchen M, Busche T, Gaspar AH, Lee JH, Ton-That H, Kalinowski J and Tauch A (2018) Transcriptome sequencing of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 provides detailed insights into its transcriptional landscape and into DtxR-mediated transcriptional regulation. *BMC Genomics* 19:1–17. doi: 10.1186/s12864-018-4481-8

Wolf T, Kämmer P, Brunke S and Linde J (2018) Two's company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 42:7–12. doi: 10.1016/j.mib.2017.09.001

Yandell M and Ence D (2012) A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nat Rev Genet* 13:329–42. doi: 10.1038/nrg3174

Yeruham I, Braverman Y, Shpigel NY, Chizov-Ginzburg A, Saran A and Winkler M (1996) Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. I. *Vet Q* 18:87–89. doi: 10.1080/01652176.1996.9694623

Zang H, Qian S, Li J, Zhou Y, Zhu Q, Cui L, Meng X, Zhu G and Wang H (2020) The effect of selenium on the autophagy of macrophage infected by *Staphylococcus aureus*. *Int Immunopharmacol* 83:106406. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106406

Zavoshti FR, Sioofy-Khojine AB and Mahpeikar HA (2009) A case report of ulcerative lymphangitis (a mini review of causes and current therapies). *Turkish J Vet Anim Sci* 33:525–528. doi: 10.3906/vet-0712-10

Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P and Romani L (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect* 11:133–141. doi: 10.1016/j.micinf.2008.10.007

Zerbino DR (2010) Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Curr Protoc Bioinforma* 1–12. doi:



10.1002/0471250953.bi1105s31

Zhang C, Yang M and Ericsson AC (2021) Function of Macrophages in Disease : Current Understanding on Molecular Mechanisms. 12:1–12. doi: 10.3389/fimmu.2021.620510

Zhang N, Bao Y, Tong AH, Zuyderduyn S, Bader GD, Peiris JSM, Lok S and Lee SM (2018) Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression profile reflecting macrophage polarization in response to influenza A H5N1 virus infection. 1–14. doi: 10.1186/s12920-018-0335-0

Zhang XF, Liu ZG, Shen W and Gurunathan S (2016) Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17091534

Zhou Z, Li H, Tian S, Yi W, Zhou Y and Yang H (2019) Critical roles of NLRP3 in inflammasome in IL-1  $\beta$  secretion induced by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in vitro. 116:11–17. doi: 10.1016/j.molimm.2019.09.016

Zlotnik A and Yoshie O (2012) The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36:705–716. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008

## 8. APÊNDICE

### Apêndice 1: Certificado de aceite do projeto de pesquisa pelo CEUA (UFPA)



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do interatoma e exossoma em *Corynebacterium pseudotuberculosis* para pesquisa de novos alvos terapêuticos", protocolada sob o CEUA nº 9220240518 (ID 001004), sob a responsabilidade de **Adriana Ribeiro Carneiro Folador e equipe**; Bruno Walter Santos Sobral ; Artur Luiz da Silva; Vasco Ariston de Carvalho Azevedo; Rommel Thiago Jucá Ramos ; Edson Luiz Folador; André Guimarães Maciel e Silva; Eziqiel de Moraes; Carlos Leonardo de Aragao Araujo; Patricia Nascimento da Silva; Jorianne Thyeska Castro Alves; Larissa Maranhao Dias; Alyne Cristina Sodrê Lima; Iago Rodrigues Blanco; Luciana Patricia Silvestre de Souza; Maria Silvanira Ribeiro Barbosa; Soraya Silva Andrade; Rinaldo Batista Viana - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 01/11/2018.

We certify that the proposal "Study of the interactome and exosome in *Corynebacterium pseudotuberculosis* for research of new therapeutic targets", utilizing 6 Ovines (males and females), protocol number CEUA 9220240518 (ID 001004), under the responsibility of **Adriana Ribeiro Carneiro Folador and team**; Bruno Walter Santos Sobral ; Artur Luiz da Silva; Vasco Ariston de Carvalho Azevedo; Rommel Thiago Jucá Ramos ; Edson Luiz Folador; André Guimarães Maciel e Silva; Eziqiel de Moraes; Carlos Leonardo de Aragao Araujo; Patricia Nascimento da Silva; Jorianne Thyeska Castro Alves; Larissa Maranhao Dias; Alyne Cristina Sodrê Lima; Iago Rodrigues Blanco; Luciana Patricia Silvestre de Souza; Maria Silvanira Ribeiro Barbosa; Soraya Silva Andrade; Rinaldo Batista Viana - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 11/01/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **06/2020**

Área: **Centro de Genômica E Biologia de Sistemas**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 3 anos**

N: **6**

Linhagem: **Santa Inês**

Peso: **20 a 30 kg**

Local do experimento: Setor de Ovino-caprinocultura da Universidade Federal do Pará- Campus Castanhal.

Belém, 01 de novembro de 2018

*M<sup>a</sup> Vivina B. Monteiro*

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

*Vanessa Joia de Mello*

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

## Apêndice 2: Modelo do TCLE



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Estudo do interatoma e exossoma em *Corynebacterium pseudotuberculosis* para pesquisa de novos alvos terapêuticos

Nome do Pesquisador Responsável: Dra. Adriana Ribeiro Carneiro Folador

Nome dos demais participantes: Dr. Bruno Walter Santos Sobral, Dr. Artur Luiz da Costa da Silva, Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos, Dr. Edson Luiz Folador, Dr. André Guimarães Maciel e Silva, Dr. Rinaldo Batista Viana, MsC. Eziquiel de Moraes, MsC. Carlos Leonardo de Aragão Araújo, MsC. Jorianne Thyessa Castro Alves, MsC. Larissa Maranhão Dias, MsC. Alyne Cristina Sodré Lima, Patrícia Nascimento da Silva, Iago Rodrigues Blanco, Luciana Patrícia Silvestre de Souza, Maria Silvanira Ribeiro Barbosa, Soraya Silva Andrade

1. **Natureza da pesquisa:** *o Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade obter o interatoma in vivo durante o processo infeccioso por Corynebacterium pseudotuberculosis, analisar o perfil transcricional do patógeno e do hospedeiro (carneiro - Ovis aries), bem como obter exossomas a partir de amostras de soro de animais sadios e infectados, simultaneamente, para melhor conhecimento das vias moleculares usadas pelo micro-organismo, além da identificação de novos fatores de virulência do patógeno, e da rota de resposta na célula hospedeira diante da exposição a esta bactéria.*
2. **Identificação dos animais:** *serão necessários seis carneiros adultos (Ovis aries), raça Santa Inês, divididos em dois grupos: três indivíduos saudáveis e três com suspeita clínica de linfadenite caseosa.*
3. **Envolvimento na pesquisa:** *ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) colete 30 ml de sangue venoso periférico de cada animal em tubos de coleta a vácuo. Antes da colheita de sangue, na veia jugular, será realizada uma tricotomia, ou seja, a retirada dos pelos na região com uma lâmina, seguida de antissepsia com álcool iodado a 5%. Para a coleta de material caseoso do animal clinicamente diagnosticado, será realizada uma cirurgia para retirada de linfonodo externo infectado (linfadenectomia). Neste procedimento, o animal será sedado por via subcutânea com cloridrato de lidocaína + epinefrina. Posteriormente, será realizada uma tricotomia, seguida de antissepsia com álcool iodado a 5% para a execução do procedimento. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a*

*continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone da Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).*

4. **Sobre os as amostras necessárias:** *será necessário coletar sangue de animais sadios e com diagnóstico clínico de linfadenite caseosa, além do material caseoso dos animais clinicamente diagnosticados com a doença.*
5. **Riscos e desconforto:** *não haverá dor intencional causada nos animais. Os animais infectados e um dos sadios serão submetidos a um breve e superficial procedimento cirúrgico de cerca de 1 hora, para retirada dos linfonodos externos, que se apresentam clinicamente acometidos pela linfadenite caseosa. Para isto, será aplicado o anestésico Cloridato de lidocaína por via subcutânea. Após o procedimento, os animais serão acompanhados por 24 horas e tratados com o analgésico Dexametasona uma vez ao dia por dois dias. Para as coletas de soro serão realizadas em animais sadios e infectados naturalmente não será necessário a aplicação de medicamento, por se tratar de um procedimento extremamente simples, não causando nenhum tipo de desconforto aos indivíduos. As coletas ocorrerão através de um tubo de coleta de sangue. Além disto, os animais serão observados em suas recuperações por cinco dias, sendo utilizados cicatrizante e antisséptico (Bactrovet). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008.*
6. **Confidencialidade:** *todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.*
7. **Benefícios:** *esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a análise da expressão gênica da interação patógeno-hospedeiro in vivo, além da caracterização de miRNAs presentes em exossomas circulantes no sangue, o que adicionará informações importantes a respeito dos genes envolvidos no desenvolvimento da infecção causada por *C. pseudotuberculosis*, bem como a resposta produzida pelo hospedeiro na tentativa de conter a doença, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir para o desenvolvimento de soluções mais eficazes e diretas contra este patógeno como a descobertas de novos alvos terapêuticos e vacinais, o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.*
8. **Pagamento:** *o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Todo o material necessário para a coleta de material biológico, instrumentos de trabalho e medicamentos serão fornecidos pelos pesquisadores.*

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

**Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.**

Eu, \_\_\_\_\_, portador de RG/CPF n° \_\_\_\_\_, telefone: \_\_\_\_\_, residente à \_\_\_\_\_, proprietário/responsável pelo(s) animal (is) \_\_\_\_\_, espécie \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, autorizo a utilizar o animal como sujeito de pesquisa para fins didáticos e científicos.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**CONTATOS:**

**Adriana Folador:** Centro de Genômica e Biologia de Sistemas, Universidade Federal do Pará (Campus Belém) - Rua Augusto Corrêa, 1 - Guamá, Belém - PA, 66075-110.

Telefone: (91) 98134-7264

E-mail: carneiroar@gmail.com

**CEUA-UFPA:** Prédio da Reitoria (Térreo), Universidade Federal do Pará (Campus Belém) - Rua Augusto Corrêa, 1 - Guamá, Belém - PA, 66075-110.

Telefone: (91) 98041-2500

E-mail: ufpa.ceua@gmail.com

## Apêndice 3: Resultados de identificação da espécie pelo MALDI Biotyper

Analyte Name: A7  
 Analyte Description:  
 Analyte ID: **OI1** congelado  
 Analyte Creation Date/Time: 2018-12-07T11:33:40.647  
 Applied MSP Library(ies):  
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB48 biovar equi	2.385	<a href="#">126782547</a>
2 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB19 biovar equi	2.371	<a href="#">126782547</a>
3 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> SP280-3 biovar ovis	2.363	<a href="#">126782547</a>
4 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB23 biovar equi	2.361	<a href="#">126782547</a>
5 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> SP280-2 biovar ovis	2.35	<a href="#">126782547</a>
6 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB79 biovar equi	2.348	<a href="#">126782547</a>
7 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB25 biovar equi	2.344	<a href="#">126782547</a>
8 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> ATCC19410 biovar ovis	2.335	<a href="#">126782547</a>
9 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB46 biovar equi	2.331	<a href="#">126782547</a>
10 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 050543 biovar equi	2.331	<a href="#">126782547</a>

Analyte Name: A9  
 Analyte Description:  
 Analyte ID: **OI3** congelado  
 Analyte Creation Date/Time: 2018-12-07T11:33:40.397  
 Applied MSP Library(ies):  
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MEX8 biovar ovis	2.413	<a href="#">126782547</a>
2 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MEX12 biovar ovis	2.382	<a href="#">126782547</a>
3 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MEX4 biovar ovis	2.35	<a href="#">126782547</a>
4 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> FRC41 biovar ovis	2.348	<a href="#">126837590</a>
5 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> FRC41 biovar ovis	2.348	<a href="#">126782547</a>
6 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CIP5297 biovar equi	2.34	<a href="#">126837590</a>
7 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 050543 biovar equi	2.34	<a href="#">126782547</a>
8 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CIP5297 biovar equi	2.34	<a href="#">126782547</a>
9 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> MB57 biovar equi	2.338	<a href="#">126782547</a>
10 (+++)	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 258 biovar equi	2.337	<a href="#">126782547</a>

## Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
<b>A</b>	<b>Species Consistency:</b> The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
<b>B</b>	<b>Genus Consistency:</b> The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
<b>C</b>	<b>No Consistency:</b> Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).



## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Artigos publicados em periódicos

1. Artigo intitulado “*Functional annotation of hypothetical proteins from the Exiguobacterium antarcticum strain B7 reveals proteins involved in adaptation to extreme environments, including high arsenic resistance*”, publicado na revista PLOS One em junho de 2018, como autor principal em autoria compartilhada.



#### RESEARCH ARTICLE

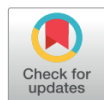
## Functional annotation of hypothetical proteins from the *Exiguobacterium antarcticum* strain B7 reveals proteins involved in adaptation to extreme environments, including high arsenic resistance

Wana Lailan Oliveira da Costa<sup>1</sup>\*, Carlos Leonardo de Aragão Araújo<sup>1</sup>\*, Larissa Maranhão Dias<sup>1</sup>, Lino César de Sousa Pereira<sup>1</sup>, Jorianne Thyeska Castro Alves<sup>1</sup>, Fabrício Almeida Araújo<sup>1</sup>, Edson Luiz Folador<sup>2</sup>, Isabel Henriques<sup>3</sup>, Artur Silva<sup>1</sup>, Adriana Ribeiro Carneiro Folador<sup>1</sup>\*

**1** Laboratory of Genomic and Bioinformatics, Center of Genomics and System Biology, Institute of Biological Science, Federal University of Para, Belém, Pará, Brazil, **2** Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **3** Biology Department & CESAM, University of Aveiro, Aveiro, Portugal

\* These authors contributed equally to this work.

\* [adrianarc@ufpa.br](mailto:adrianarc@ufpa.br), [carneiroar@gmail.com](mailto:carneiroar@gmail.com)



#### OPEN ACCESS

**Citation:** da Costa WLO, Araújo CLdA, Dias LM, Pereira LCdS, Alves JTC, Araújo FA, et al. (2018) Functional annotation of hypothetical proteins from the *Exiguobacterium antarcticum* strain B7 reveals proteins involved in adaptation to extreme environments, including high arsenic resistance. PLoS ONE 13(6): e0198965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198965>

**Editor:** Honghuang Lin, Boston University, UNITED STATES

**Received:** January 12, 2018

**Accepted:** May 28, 2018

**Published:** June 25, 2018

**Copyright:** © 2018 da Costa et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (88881.068052/2014-01) and PROPESP/UFPA for the financial support on this study. We also acknowledge FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal) financing to CESAM (UID/

### Abstract

*Exiguobacterium antarcticum* strain B7 is a psychrophilic Gram-positive bacterium that possesses enzymes that can be used for several biotechnological applications. However, many proteins from its genome are considered hypothetical proteins (HPs). These functionally unknown proteins may indicate important functions regarding the biological role of this bacterium, and the use of bioinformatics tools can assist in the biological understanding of this organism through functional annotation analysis. Thus, our study aimed to assign functions to proteins previously described as HPs, present in the genome of *E. antarcticum* B7. We used an extensive *in silico* workflow combining several bioinformatics tools for function annotation, sub-cellular localization and physicochemical characterization, three-dimensional structure determination, and protein-protein interactions. This genome contains 2772 genes, of which 765 CDS were annotated as HPs. The amino acid sequences of all HPs were submitted to our workflow and we successfully attributed function to 132 HPs. We identified 11 proteins that play important roles in the mechanisms of adaptation to adverse environments, such as flagellar biosynthesis, biofilm formation, carotenoids biosynthesis, and others. In addition, three predicted HPs are possibly related to arsenic tolerance. Through an *in vitro* assay, we verified that *E. antarcticum* B7 can grow at high concentrations of this metal. The approach used was important to precisely assign function to proteins from diverse classes and to infer relationships with proteins with functions already described in the literature. This approach aims to produce a better understanding of the mechanism by which this bacterium adapts to extreme environments and to the finding of targets with biotechnological interest.

2. Artigo intitulado “Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology”, publicado na revista Gene em março de 2019, como autor principal.

Gene 702 (2019) 36–45



Research paper

## Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology

Carlos Leonardo Araújo<sup>a</sup>, Jorianne Alves<sup>a</sup>, Wylerson Nogueira<sup>b</sup>, Lino César Pereira<sup>a</sup>, Anne Cybelle Gomide<sup>b</sup>, Rommel Ramos<sup>a</sup>, Vasco Azevedo<sup>b</sup>, Artur Silva<sup>a</sup>, Adriana Folador<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Center of Genomics and System Biology, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil  
<sup>b</sup>Department of General Biology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Corynebacterium pseudotuberculosis*  
 Core genome  
 Omics approaches  
 Reverse vaccinology

### ABSTRACT

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiologic agent of veterinary relevance diseases, such as caseous lymphadenitis, affecting different animal species causing damage to the global agribusiness. So far, there are no completely effective treatment methods to overcome the impacts caused by this pathogen. Several genomes of the species are deposited on public databases, allowing the execution of studies related to the pan-genomic approach. In this study, we used an integrated *in silico* workflow to prospect novel putative targets using the core genome, a set of shared genes among 65 *C. pseudotuberculosis* strains. Subsequently, through RNA-Seq data of the same abiotic stresses in two strains, we selected only induced genes to compose the reverse vaccinology workflow based in two different strategies. Our results predicted six probable antigens in both analysis, which indicates that they have a strong potential to be used in further studies as vaccine targets against this bacterium.

### 1. Introduction

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive, pleomorphic, facultative intracellular, β-hemolytic bacterium and the etiologic agent of diseases with zoonotic relevance. Among them, caseous lymphadenitis, ulcerative lymphangitis, mastitis, and ulcerative dermatitis (Chirino-Zárraga et al., 2006; Dorella et al., 2006). These pathologies affect several animal species, such as goats, sheep, buffaloes, cattle, horses, and llamas, causing economic losses to producers worldwide (Al-Gaabary et al., 2009; Çetinkaya et al., 2002). Studies have reported strains isolated in different parts of the world, but the species is more prevalent in regions, such as in Asian, Arab, and African countries, as well as Oceania, North America, and Latin America (Radusky et al., 2015). This species is divided according to the capacity of the isolates to catalyze the reduction of nitrate (Barakat et al., 1984). Biovar *ovis* (type I), nitrate-reductase negative, affects mainly small ruminants (Abebe and Sisay Tessema, 2015), and the biovar *equi* (type II), nitrate-reductase positive, affects horses (Baraúna et al., 2017).

In the infectious process of *C. pseudotuberculosis*, primary immune responses are mediated by cytokines and secondary responses can occur

through multiple pathways. Major histocompatibility class II (MHC II) complexes and several subpopulations of lymphocytes organized in three regions were identified within the encapsulated lesions, which shows that recruitment of defense cells is a characteristic of caseous lymphadenitis, the major disease related to the bacteria (Ellis et al., 1991; Walker et al., 1991).

After phagocytosis, the phagosome rapidly becomes acid, which negatively affects the metabolism of the pathogen, causing damages in its macromolecules. In addition, other types of intracellular stresses affect the bacterium, including oxidative, thermal and nitrosative shocks, as well as surface and osmotic stresses (Pinto et al., 2014). However, the pathogen can survive within macrophages, and this capacity is essential for the migration of *C. pseudotuberculosis* from the place where the initial infection occurred to internal lymph nodes and other tissues. Once the barriers caused by abiotic stresses have been circumvented as a protective mechanism of the immune system, the bacterium establishes itself in the host causing the chronic infections that persist throughout the life of the animal (Baird and Fontaine, 2007).

Due to the importance of this pathogen, several genomes of the

**Abbreviations:** MHC I, Major histocompatibility class I complex; MHC II, Major histocompatibility class II complex; BHI, Brain Heart Infusion; FPKM, Fragments per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped; RV, Reverse Vaccinology; NCBI, National Center for Biotechnology Information; PGAP, Pan-Genomes Analysis Pipeline; MED, Mature Epitopes Density; PSE, Potentially Surface Exposed; SEC, Secreted; MW, Molecular Weight; DEG, Database of Essential Genes; TMHs, Transmembrane helices; TCRS, Two-component regulatory systems

\* Corresponding author.

E-mail address: carneiroar@gmail.com (A. Folador).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.049>

Received 27 December 2018; Received in revised form 15 March 2019; Accepted 21 March 2019

Available online 27 March 2019

0378-1119/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

3. Artigo intitulado “*In silico functional prediction of hypothetical proteins from the core genome of Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*”, publicado em agosto de 2020 na revista PeerJ, como autor principal



## In silico functional prediction of hypothetical proteins from the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*

Carlos Leonardo Araújo<sup>1,\*</sup>, Iago Blanco<sup>1,\*</sup>, Luciana Souza<sup>1</sup>, Sandeep Tiwari<sup>2</sup>, Lino César Pereira<sup>1</sup>, Preetam Ghosh<sup>3</sup>, Vasco Azevedo<sup>2</sup>, Artur Silva<sup>1</sup> and Adriana Folador<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Center of Genomics and Systems Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>2</sup> Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Department of Computer Science, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

\* These authors contributed equally to this work.

### ABSTRACT

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a pathogen of veterinary relevance diseases, being divided into two biovars: *equi* and *ovis*; causing ulcerative lymphangitis and caseous lymphadenitis, respectively. The isolation and sequencing of *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* strains in the Northern and Northeastern regions of Brazil exhibited the emergence of this pathogen, which causes economic losses to small ruminant producers, and condemnation of carcasses and skins of animals. Through the pan-genomic approach, it is possible to determine and analyze genes that are shared by all strains of a species—the core genome. However, many of these genes do not have any predicted function, being characterized as hypothetical proteins (HP). In this study, we considered 32 *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* genomes for the pan-genomic analysis, where were identified 172 HP present in a core genome composed by 1255 genes. We are able to functionally annotate 80 sequences previously characterized as HP through the identification of structural features as conserved domains and families. Furthermore, we analyzed the physicochemical properties, subcellular localization and molecular function. Additionally, through RNA-seq data, we investigated the differential gene expression of the annotated HP. Genes inserted in pathogenicity islands had their virulence potential evaluated. Also, we have analyzed the existence of functional associations for their products based on protein–protein interaction networks, and perform the structural prediction of three targets. Due to the integration of different strategies, this study can underlie deeper in vitro researches in the characterization of these HP and the search for new solutions for combat this pathogen.

**Subjects** Computational Biology, Genomics, Microbiology, Veterinary Medicine

**Keywords** Hypothetical proteins, Functional annotation, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous lymphadenitis

Submitted 29 January 2020

Accepted 10 July 2020

Published 26 August 2020

Corresponding author  
Adriana Folador,  
carneiroar@gmail.com

Academic editor  
Pedro Silva

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 17

DOI 10.7717/peerj.9643

© Copyright  
2020 Araújo et al.

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

**OPEN ACCESS**

**How to cite this article** Araújo CL, Blanco I, Souza L, Tiwari S, Pereira LC, Ghosh P, Azevedo V, Silva A, Folador A. 2020. In silico functional prediction of hypothetical proteins from the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. *PeerJ* 8:e9643 DOI 10.7717/peerj.9643

4. Artigo intitulado “*Proteins from the core genome of Corynebacterium ulcerans respond for pathogenicity and reveal promising vaccine targets for diphtheria*”, publicado em outubro de 2021 na revista Microbial Pathogenesis.

Microbial Pathogenesis 161 (2021) 105263



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)



## Proteins from the core genome of *Corynebacterium ulcerans* respond for pathogenicity and reveal promising vaccine targets for diphtheria

Andressa O. Aragão<sup>a,\*\*\*,1</sup>, Iago R. Blanco<sup>a,\*,1</sup>, Luciana P.S. Souza<sup>a</sup>, Rommel T.J. Ramos<sup>a</sup>, Luís C. Guimarães<sup>a</sup>, Artur L. Silva<sup>a</sup>, Vasco A.C. Azevedo<sup>b</sup>, Carlos Leonardo A. Araújo<sup>a</sup>, Adriana R.C. Folador<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Center of Genomics and Systems Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil  
<sup>b</sup> Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Corynebacterium ulcerans*  
 Core genome  
 Diphtheria  
 Reverse vaccinology  
 Virulence

### ABSTRACT

*Corynebacterium ulcerans* is an emerging pathogen able to transmit the acute infection diphtheria to humans. Although there is a well-established vaccine based on the toxin produced by *Corynebacterium diphtheriae*, another species of this genus known to cause the disease, there is still no vaccine formulations described for *C. ulcerans*; this fact contributes to the increase in cases of infection that has been observed. In this study, we want to provide information at the genomic level of this bacterium in order to suggest proteins as possible vaccine targets. We carried out an *in silico* prospection of vaccine candidates through reverse vaccinology for targets that exhibit antigenic potential against diphtheria. We found important virulence factors, such as adhesion-related ones, that are responsible for pathogen-host interaction after infection, but we did not find the diphtheria toxin, which is the main component of the currently available vaccine. This study provides detailed information about the exoproteome and hypothetical proteins from the core genome of *C. ulcerans*, suggesting vaccine targets to be further tested *in vitro* for the development of a new vaccine against diphtheria.

### 1. Introduction

*Corynebacterium ulcerans* is a diphtheroid Gram-positive, bacillus-type, aerobic, non-sporulated, non-mobile and pleomorphic bacterium [1]. It causes a zoonotic infection similar to diphtheria caused by *Corynebacterium diphtheriae*. Studies indicate that signs and symptoms of a diphtheria-like illness caused by *C. ulcerans* are milder than those caused by *C. diphtheriae*. However, some strains of *C. ulcerans* produce potent diphtheria toxin and may cause severe symptoms similar to those caused by *C. diphtheriae* [2,3].

*C. ulcerans* strains can be categorized as toxigenic or non-toxigenic. The first group is responsible for producing diphtheria toxin (DT), encoded by the *tox* gene, the main factor associated with the transmission of diphtheria. However, diphtheria manifestation is not exclusively dependent on DT apparently. Some non-toxigenic strains of *C. diphtheriae* for example have been involved in cases of septicemia

causing atypical course of the disease [4].

The transmission of diphtheria in humans is possible upon the absence of DT, suggesting that additional factors contribute to the pathogenesis persistence [5]. Despite this, the vaccines available are based on DT isolated from *C. diphtheriae*, with no vaccines described for *C. ulcerans*. However, other toxins from *C. ulcerans* can cause serious infections in humans and other animals due to additional virulence factors (VF) [6], once the pathogenicity of *C. ulcerans* does not necessarily depend on the production of DT, so to predict targets for this study, we did not focus only on toxigenic strains, considering the possible role of non-toxigenic strains in transmitting diphtheria due to additional factors [7,8].

In order to solve the problem of increasing infections by *C. ulcerans*, studies about this pathogen reveal more about pathogenicity mechanisms, including cytotoxic proteins in the infection process [6]. For this, reverse vaccinology (RV) allows the prediction of vaccine candidates

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

\*\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [andressa.arag@gmail.com](mailto:andressa.arag@gmail.com) (A.O. Aragão), [iagosblancos@gmail.com](mailto:iagosblancos@gmail.com) (I.R. Blanco), [adrianarc@ufpa.br](mailto:adrianarc@ufpa.br), [carneiroar@gmail.com](mailto:carneiroar@gmail.com) (A.R.C. Folador).

<sup>1</sup> These authors contributed equally for this work.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105263>

Received 28 April 2021; Received in revised form 14 October 2021; Accepted 19 October 2021

Available online 21 October 2021

0882-4010/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

## Anexo 2: Capítulos de livro publicados

1. Capítulo intitulado “*The Genus Corynebacterium in the Genomic Era*”, publicado no livro “*Basic Biology and Applications of Actinobacteria*” da editora IntechOpen em dezembro de 2018, como autor principal.

---

### Chapter 4

---

## The Genus *Corynebacterium* in the Genomic Era

---

Carlos Leonardo Araújo, Jorianne Alves, Alyne Lima,  
Larissa Dias, Patricia Silva, Joana Marques,  
Vasco Azevedo, Artur Silva and Adriana Folador

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80445>

---

### Abstract

This chapter will address the main omics approaches used in studies involving the genus *Corynebacterium*, Gram-positive microorganisms that can be isolated from many diverse environments. Currently, the genus *Corynebacterium* has more than 130 highly diversified species, many of which present medical, veterinary and biotechnological importance, such as *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *C. glutamicum*. Due to the wide application in these fields, several omics methodologies are used to better elucidate the species belonging to this genus, such as genomics, transcriptomics and proteomics. The genomic era has contributed to the development of more advanced and complex approaches that enable the increase of generated data, and consequently the advance on the structural, functional and dynamic knowledge of biological systems.

**Keywords:** *Corynebacterium*, genomic era, genomics, transcriptomics, proteomics

### 1. Introduction

The genus *Corynebacterium* was proposed by Lehman and Neumann in 1896, to describe a type strain bacillus *Corynebacterium diphtheriae*. However, antecedent to its final taxonomic classification, *C. diphtheriae* had already been described as synonymous species such as *Microsporon diphthericum*, *Bacillus diphtheriae*, and *Pacinia loeffleri*. After its classification, the species was again described as the synonym *Mycobacterium diphtheriae* by Krasil'nikov in 1941 [1]. Afterward, the genus came to accommodate other bacterial species that presented

2. Capítulo intitulado “*In silico pathogenomic analysis of Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*”, publicado no livro *Advances in Bioinformatics and Computational Biology* em dezembro de 2020.



## ***In silico Pathogenomic Analysis of Corynebacterium Pseudotuberculosis Biovar Ovis***

Iago Rodrigues Blanco , Carlos Leonardo Araújo ,  
and Adriana Carneiro Folador  

Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Center of Genomics and Systems Biology,  
Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil  
adrianarc@ufpa.br

**Abstract.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a pathogenic bacterium that may transmit caseous lymphadenitis, veterinary infection that severely attacks animals such as goats and sheep. It is known that the toxin Phospholipase D is the major virulence factor associated with this disease. However, genomic computational studies can reveal further information concerning pathogenicity mechanisms of bacteria. Through sequence analysis tools, it is possible to assess the genomic bases of these mechanisms and to analyze similarities among the different strains of this species. Nitrate reductase-negative bacteria are classified in the biovar *ovis*, able to transmit the infection. Thus, we developed an *in silico* comparative pathogenomic analysis with genomes of 33 strains of *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* strains, which cause caseous lymphadenitis. Looking for the identification of pathogenicity-related genes, virulence factors and composition of pathogenicity islands, it was possible to computationally predict pathogenicity potentials of target proteins and their respective biological processes during infection, besides identification of prophage genome elements and prediction of protein protein interactions.

**Keywords:** Pathogenomics · *Corynebacterium pseudotuberculosis* · Pathogenicity islands · Virulence factors

## Anexo 3: Resumos publicados em anais de congressos

1. **ARAÚJO, C. L. A.**; ALVES, J. T. C. ; DIAS, LARISSA M. ; AZEVEDO, VASCO ; SILVA, A. ; Folador, Adriana . Transcriptomic and structural profile of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* pantothenate synthetase. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió
2. **ARAÚJO, C. L. A.**; AMARAL, S.C.; NOVAES, T.I.C.; FAIAL, G.B.; DIAS, LARISSA M. ; LIMA, I.B. . Comparative genomics study of *Lactobacillus plantarum* strains provides perspectives about proteins related to probiogenomics. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió.
3. SOUZA, LPS ; **ARAÚJO, C. L** ; BLANCO, IR ; SILVA, ARTUR ; Folador, ARC . In silico genomic analysis of multiple *Corynebacterium ulcerans* strains. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. BLANCO, IR ; **ARAÚJO, C. L** ; SOUZA, LPS ; SILVA, ARTUR ; Folador, Adriana . Prospection of vaccine targets for difteria from the *Corynebacterium ulcerans* core exoproteome by reverse vaccinology. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió.
4. DIAS, L.M ; ALVES, JTC ; **ARAÚJO, C. L** ; SILVA, A. ; Folador, ARC . Comparative genomics study of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 226 (biovar ovis). In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. Livro de Resumos do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019. MORAES, C. N. S. ; **ARAÚJO, C. L. A.** ; ARAGAO, A. O. ; ALVES, JTC ; BARRETO, DF ; DIAS, L.M ; BARAÚNA, RAB ; HENRIQUES, I ; SILVA, A. ; Folador, Adriana . Genetic characterization of *Klebsiella* sp. APC28, a multiresistant antibiotic strain isolated from Água Preta Lake, Belém, Brazil. In: 30º Congresso Brasileiro Microbiologia, 2019, Maceió. Livro de Resumos do 30º Congresso Brasileiro Microbiologia CBM 2019, 2019.
5. **ARAÚJO, CLA.**; ALVES, JTC; SILVA, PN.; AZEVEDO, V.; SILVA, A.; FOLADOR, ARC. Abordagem *in silico* para a caracterização estrutural e funcional da ferritina Dps, presente no genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: Congresso Latino-americano de Microbiologia (ALAM 2018), 2018, Santiago.
6. LIMA, ACS; **ARAÚJO, CLA.**; FOLADOR, E. L.; AZEVEDO, V.; BARAÚNA, R.A.; SILVA, A. Análise comparativa de espécies patogênicas e não patogênicas de *Corynebacterium* spp. In: XXIV Congresso Latino-americano de Microbiologia (ALAM 2018), 2018, Santiago.

7. MOURA, VAG.; COSTA, WLO; LIMA, ACS; PAIXAO, CTM; **ARAÚJO, CLA**; DE SOUSA, RRI; LACERDA, JRM; MATTOS-GUARALDI, AL; SILVA, A; FOLADOR, ARC; MARQUES, JM. Análise do perfil clonal de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* oriundas de pequenos ruminantes diagnosticados com Linfadenite Caseosa no Estado do Pará. In: XXIV Congresso Latino-americano de Microbiologia (ALAM 2018), 2018, Santiago.
8. SOUZA, LPS; BLANCO, IR; **ARAÚJO, CLA**; PEREIRA, LCS; AZEVEDO, V; SILVA, A; FOLADOR, ARC. Anotação funcional de proteínas hipotéticas presentes no genoma central de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. In: XXIV Congresso Latino-americano de Microbiologia (ALAM 2018), 2018, Santiago.
9. SOUZA, LPS; COSTA, WLD; **ARAÚJO, CLA**; DIAS, LM; FOLADOR, ARC. Anotação Funcional de proteínas hipotéticas da bactéria extremófila *Exiguobacterium antarcticum* B7, por abordagens de bioinformática. In: XXIX Seminário de Iniciação Científica (SEMINIC), 2018, Belém.
10. ALVES, JTC; BRABO, GLC; DIAS, LM; **ARAÚJO, CLA**; HENRIQUES, I; BARAÚNA, RA; SILVA, A; FOLADOR, ARC. Caracterização de bactérias Gram-negativas resistentes à antibióticos  $\beta$ -lactâmicos no Lago Bolonha, Manancial de Belém, Pará - Brasil. In: XXIV Congresso Latino-Americano de Microbiologia (ALAM 2018), 2018, Santiago.
11. PAIXAO, CTM; MOURA, VAG; **ARAÚJO, CLA**; ALVES, JTC; DIAS, LM; SILVA, A; FOLADOR, ARC. Pangenoma de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de hospedeiros caprinos. In: III Encontro Nacional dos Estudantes de Biotecnologia (NÚCLEO 17), 2017, Salvador.
12. **ARAÚJO, CLA**; DIAS, LM; ALVES, JTC; COSTA, WLO; BARRETO, DF; DE SÁ, PHCG; SILVA, A; FOLADOR, ARC. Study of the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to new therapeutic targets prospection. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.
13. BARRETO, DF; ALVES, JTC; **ARAÚJO, CLA**; DIAS, LM; COSTA, WLO; BARAÚNA, RAB; ARAUJO, S; HENRIQUES, I; SILVA, A; FOLADOR, ARC. Genetic characterization of *Klebsiella* sp. antibiotic resistant from Água Preta Lake fountain from Belém, Pará. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.



14. ALVES, JTC; **ARAÚJO, CLA**; DIAS, LM; COSTA, WLO; BARRETO, DF; CASTRO, IRR; BARAÚNA, RAB; SILVA, A; FOLADOR, ARC. The bioprospection of Gram-negative bacteria resistant to beta-lactam antibiotic in Lake Bolonha, Pará - Brazil. In: 29<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.
15. LIMA, ACS; **ARAÚJO, CLA**; PAIXAO, CTM; RAMOS, RTJ; AZEVEDO, V; BARAÚNA, RAB; SILVA, A. Identification and characterization *in silico* cluster of *tox* gene in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 29<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.
16. BARRETO, DF; ALVES, JTC; **ARAÚJO, CLA**; DIAS, LM; COSTA, WLO; BARAÚNA, RAB; SILVA, A; FOLADOR, ARC. Assembly and functional annotation of genomes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* and *ovis*. In: 29<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 29<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017.