



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVI JOSUÉ MARCON

**PREDIÇÃO FUNCIONAL DE GENES DE RESISTÊNCIA EM
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR EQUI APÓS
INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA E ENROFLOXACINA**

**Belém
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVI JOSUÉ MARCON

**PREDIÇÃO FUNCIONAL DE GENES DE RESISTÊNCIA EM
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR EQUI APÓS
INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA E ENROFLOXACINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecno-
logia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna

**Belém
2022**

Marcon, Davi

Predição funcional de genes de resistência em *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi após indução da resistência a rifampicina e enrofloxacin/ DAVI JOSUÉ MARCON. – Belém, 2022.

32 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna

Monografia – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2022.

1. Bioinformática. 2. Curadoria de genomas. 3. Fechamento de gaps. I. Título.

ERRATA

Elemento opcional da ABNT (2011, 4.2.1.2). Exemplo:

FERRIGNO, C. R. A. **Tratamento de neoplasias ósseas apendiculares com reimplantação de enxerto ósseo autólogo autoclavado associado ao plasma rico em plaquetas**: estudo crítico na cirurgia de preservação de membro em cães. 2011. 128 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
1	10	auto-conclavo	autoconclavo

DAVI JOSUÉ MARCON

**PREDIÇÃO FUNCIONAL DE GENES DE RESISTÊNCIA EM
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR EQUI
APÓS INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA E
ENROFLOXACINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Data da Defesa:
Conceito:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Orientador

Prof. Dr. Nome Sobrenome
Faculdade de Computação - UFPA
Membro da Banca

Prof. Dra. Nome Sobrenome
Faculdade de Biotecnologia - UFPA
Membro da Banca

Belém
2022

*Este trabalho é dedicado às crianças adultas que,
quando pequenas, sonharam em se tornar cientistas.*

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos principais são direcionados à Gerald Weber, Miguel Frasson, Leslie H. Watter, Bruno Parente Lima, Flávio de Vasconcellos Corrêa, Otavio Real Salvador, Renato Machnievscz¹ e todos aqueles que contribuíram para que a produção de trabalhos acadêmicos conforme as normas ABNT com L^AT_EX fosse possível.

Agradecimentos especiais são direcionados ao Centro de Pesquisa em Arquitetura da Informação² da Universidade de Brasília (CPAI), ao grupo de usuários *latex-br*³ e aos novos voluntários do grupo *abnT_EX2*⁴ que contribuíram e que ainda contribuirão para a evolução do abnT_EX2.

¹ Os nomes dos integrantes do primeiro projeto abnT_EX foram extraídos de [<http://codigolivre.org.br/projects/abntex/>](http://codigolivre.org.br/projects/abntex/)

² [<http://www.cpai.unb.br/>](http://www.cpai.unb.br/)

³ [<http://groups.google.com/group/latex-br>](http://groups.google.com/group/latex-br)

⁴ [<http://groups.google.com/group/abntex2>](http://groups.google.com/group/abntex2) e [<http://www.abntex.net.br/>](http://www.abntex.net.br/)

RESUMO

Segundo a ABNT (2003, 3.1-3.2), o resumo deve ressaltar o objetivo, o método, os resultados e as conclusões do documento. A ordem e a extensão destes itens dependem do tipo de resumo (informativo ou indicativo) e do tratamento que cada item recebe no documento original. O resumo deve ser precedido da referência do documento, com exceção do resumo inserido no próprio documento. (...) As palavras-chave devem figurar logo abaixo do resumo, antecedidas da expressão Palavras-chave:, separadas entre si por ponto e finalizadas também por ponto.

Palavras-chave: latex. abntex. editoração de texto.

ABSTRACT

This is the english abstract.

Keywords: latex. abntex. text editoration.

RÉSUMÉ

Il s'agit d'un résumé en français.

Mots-clés : latex. abntex. publication de textes.

RESUMEN

Este es el resumen en español.

Palabras clave: latex. abntex. publicación de textos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ALGORITMOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

abnTeX ABsurdas Normas para TeX

LISTA DE SÍMBOLOS

Γ	Letra grega Gama
Λ	Lambda
ζ	Letra grega minúscula zeta
\in	Pertence

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Contexto	19
1.2	Justificativa	19
1.3	Objetivos	19
1.3.1	Objetivo Geral	19
1.3.2	Objetivos Específicos	19
1.4	Metodologia	19
1.4.1	Obtenção das amostras	19
1.4.2	Determinação da sensibilidade a antibióticos	20
1.4.3	Indução de resistência	20
1.4.4	Sequenciamento das amostras	20
1.4.5	Chamada, predição e avaliação dos variantes	20
1.5	Estrutura do Trabalho	21
2	REFERENCIAIS TEÓRICOS	22
2.1	<i>C. pseudotuberculosis</i>	22
2.1.1	Linfadenite Caseosa	22
2.1.2	Biovars	22
2.1.3	Níveis de susceptibilidade a antibióticos	22
2.2	Mutações como mecanismo de resistência em gram negativos	22
2.2.1	Modificação em sítio	22
2.3	Resistência induzida por doses sub-letais	22
3	RESULTADOS	23
4	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25
	APÊNDICES	26
	APÊNDICE A – QUISQUE LIBERO JUSTO	27
	APÊNDICE B – NULLAM ELEMENTUM URNA	28
	ANEXOS	29
	ANEXO A – MORBI ULTRICES RUTRUM LOREM	30
	ANEXO B – CRAS NON URNA SED	31
	ANEXO C – FUSCE FACILISIS LACINIA DUI	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

A infecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pode causar patologias em equinos, manifestando-se em três formas diferentes: linfangite ulcerativa e abscessos externos e internos (ALEMAN et al., 1996), estas infecções são tratadas com antibióticos de diferentes classes, dentre eles a rifampicina e enrofloxacina. Indivíduos dessa espécie apresentaram altas taxas de sensibilidade (RHODES et al., 2015), porém o uso de antibióticos em rebanhos pode levar a mudanças no atual quadro da espécie.

1.2 Justificativa

O presente estudo justifica-se como exploratório pois busca induzir o desenvolvimento mecanismos de resistência a antibióticos na espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar equi* que permanecem pouco estudados devido aos altos níveis de sensibilidade encontrados na espécie, o conhecimento a respeito desses mecanismos é de grande valor para uma melhor compreensão da relação da espécie com fármacos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Identificar quais mutações no genoma da *C. pseudotuberculosis* MB122, MB154 MB302, MB336; estão associadas a resistência aos antibióticos enrofloxacina e rifampicina.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Induzir cepas selvagens a resistência aos antibióticos enrofloxacina e rifampicina
2. Sequenciar o DNA dos isolados multirresistentes
3. Predizer mutações nos genomas sequenciados utilizando abordagens computacionais

1.4 Metodologia

1.4.1 Obtenção das amostras

Cepas *wild type* de *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar equi* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Vasco Azevedo da Universidade Federal de Minas Gerais, estas cepas são

identificadas pelas sigas MB122, MB154, MB302 e MB336, e seus genomas estão depositados no banco de dados NCBI sob os códigos de acesso: TODO. As amostras foram isoladas, genotipadas e sequenciadas em um estudo anterior (BARAÚNA et al., 2017). A pureza destas amostras foi verificada através de sequenciamento (TODO MARCA DO SEQUENCIADOR) dos fragmentos resultantes da amplificação das regiões V3 e V4 do rna ribossomal 16s, utilizando os primers 8F e 1492R.

1.4.2 Determinação da sensibilidade a antibióticos

A sensibilidade aos antibióticos enroflaxacina e rifampicina foram determinadas utilizando teste de concentração inibitória mínima em microdiluição em caldo mueller hinton de acordo com o descrito nas normas M100 e MD45 do CLSI (2015,2020). Utilizando pré inóculo em meio *Brain Heart Infusion* adicionado de *tween* 80 0.2% e ajustado para 0.5 na escala *MacFarland* seguindo o proposto por Rhodes e colaboradores (2015). As cepas foram submetidas a dois testes de sensibilidade, inicialmente após a confirmação da pureza das amostras, e após a indução de resistência por cultivo em placa.

1.4.3 Indução de resistência

As cepas foram induzidas a resistência com doses sub-letais de antibiótico através de cultivo em meio BHI sólido suplementado com antibióticos, modificando o protocolo utilizado por Hoeksema e colaboradores (2019) com modificação para uso em meio que favoreça o crescimento de *C. Pseudotuberculosis*. As cepas foram consideradas resistentes quando o valor inibitório mínimo foi superior a 4 vezes o valor inicial.

1.4.4 Sequenciamento das amostras

Após a obtenção de clones resistentes, seus materiais genéticos foram extraídos utilizando o kit (TODO KIT DE EXTRAÇÃO), e sequenciados utilizando a plataforma (TODO PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO) seguindo os protocolos dos fabricantes.

1.4.5 Chamada, predição e avaliação dos variantes

As leituras advindas do sequenciamento foram avaliadas utilizando os programas FASTQC e MULTIQC e posteriormente filtradas com a ferramenta TRIMMOMATIC, posteriormente os variantes foram detectados utilizando os genomas das amostras *wild type* como base para a chamada com o software GATK, posteriormente o software SnpEff foi utilizado para predição funcional dos variantes.

O *score* SHIFT foi utilizado para avaliação quanto a significância das mutações previstas para a estrutura proteica traduzida a partir do rna transcrito a partir das sequências mutantes.

1.5 Estrutura do Trabalho

2 REFERENCIAIS TEÓRICOS

2.1 *C. pseudotuberculosis*

2.1.1 Linfadenite Caseosa

2.1.2 Biovares

2.1.3 Níveis de susceptibilidade a antibióticos

2.2 Mutações como mecanismo de resistência em gram negativos

2.2.1 Modificação em sítio

2.3 Resistência induzida por doses sub-letais

3 RESULTADOS

4 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

- ALEMAN, M. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 4, p. 804–809, 1996.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6028**: Resumo - apresentação. Rio de Janeiro, 2003. 2 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação — trabalhos acadêmicos — apresentação. Rio de Janeiro, 2005. 9 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação — trabalhos acadêmicos — apresentação. Rio de Janeiro, 2011. 15 p. Substitui a Ref. ABNT (2005).
- BARAÚNA, R. A. et al. Assessing the genotypic differences between strains of *corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi through comparative genomics. **PLOS ONE**, Public Library of Science, v. 12, n. 1, p. 1–19, 01 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170676>.
- CLSI. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. 3. ed. Wayne, PA: CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 30. ed. Wayne, PA: CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- HOEKSEMA, M. et al. Effects of a previously selected antibiotic resistance on mutations acquired during development of a second resistance in *escherichia coli*. **BMC Genomics**, Springer Science and Business Media LLC, v. 20, n. 1, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5648-7>.
- RHODES, D. et al. Minimum inhibitory concentrations of equine *corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996–2012). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 1, p. 327–332, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvim.12534>.

Apêndices

APÊNDICE A – QUISQUE LIBERO JUSTO

Quisque facilisis auctor sapien. Pellentesque gravida hendrerit lectus. Mauris rutrum sodales sapien. Fusce hendrerit sem vel lorem. Integer pellentesque massa vel augue. Integer elit tortor, feugiat quis, sagittis et, ornare non, lacus. Vestibulum posuere pellentesque eros. Quisque venenatis ipsum dictum nulla. Aliquam quis quam non metus eleifend interdum. Nam eget sapien ac mauris malesuada adipiscing. Etiam eleifend neque sed quam. Nulla facilisi. Proin a ligula. Sed id dui eu nibh egestas tincidunt. Suspendisse arcu.

APÊNDICE B – NULLAM ELEMENTUM URNA

Nunc velit. Nullam elit sapien, eleifend eu, commodo nec, semper sit amet, elit. Nulla lectus risus, condimentum ut, laoreet eget, viverra nec, odio. Proin lobortis. Curabitur dictum arcu vel wisi. Cras id nulla venenatis tortor congue ultrices. Pellentesque eget pede. Sed eleifend sagittis elit. Nam sed tellus sit amet lectus ullamcorper tristique. Mauris enim sem, tristique eu, accumsan at, scelerisque vulputate, neque. Quisque lacus. Donec et ipsum sit amet elit nonummy aliquet. Sed viverra nisl at sem. Nam diam. Mauris ut dolor. Curabitur ornare tortor cursus velit.

Morbi tincidunt posuere arcu. Cras venenatis est vitae dolor. Vivamus scelerisque semper mi. Donec ipsum arcu, consequat scelerisque, viverra id, dictum at, metus. Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut pede sem, tempus ut, porttitor bibendum, molestie eu, elit. Suspendisse potenti. Sed id lectus sit amet purus faucibus vehicula. Praesent sed sem non dui pharetra interdum. Nam viverra ultrices magna.

Aenean laoreet aliquam orci. Nunc interdum elementum urna. Quisque erat. Nullam tempor neque. Maecenas velit nibh, scelerisque a, consequat ut, viverra in, enim. Duis magna. Donec odio neque, tristique et, tincidunt eu, rhoncus ac, nunc. Mauris malesuada malesuada elit. Etiam lacus mauris, pretium vel, blandit in, ultricies id, libero. Phasellus bibendum erat ut diam. In congue imperdiet lectus.

Anexos

ANEXO A – MORBI ULTRICES RUTRUM LOREM

Sed mattis, erat sit amet gravida malesuada, elit augue egestas diam, tempus scelerisque nunc nisl vitae libero. Sed consequat feugiat massa. Nunc porta, eros in eleifend varius, erat leo rutrum dui, non convallis lectus orci ut nibh. Sed lorem massa, nonummy quis, egestas id, condimentum at, nisl. Maecenas at nibh. Aliquam et augue at nunc pellentesque ullamcorper. Duis nisl nibh, laoreet suscipit, convallis ut, rutrum id, enim. Phasellus odio. Nulla nulla elit, molestie non, scelerisque at, vestibulum eu, nulla. Ut odio nisl, facilisis id, mollis et, scelerisque nec, enim. Aenean sem leo, pellentesque sit amet, scelerisque sit amet, vehicula pellentesque, sapien.

ANEXO B – CRAS NON URNA SED

Sed consequat tellus et tortor. Ut tempor laoreet quam. Nullam id wisi a libero tristique semper. Nullam nisl massa, rutrum ut, egestas semper, mollis id, leo. Nulla ac massa eu risus blandit mattis. Mauris ut nunc. In hac habitasse platea dictumst. Aliquam eget tortor. Quisque dapibus pede in erat. Nunc enim. In dui nulla, commodo at, consectetur nec, malesuada nec, elit. Aliquam ornare tellus eu urna. Sed nec metus. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas.

ANEXO C – FUSCE FACILISIS LACINIA DUI

Phasellus id magna. Duis malesuada interdum arcu. Integer metus. Morbi pulvinar pellentesque mi. Suspendisse sed est eu magna molestie egestas. Quisque mi lorem, pulvinar eget, egestas quis, luctus at, ante. Proin auctor vehicula purus. Fusce ac nisl aliquam ante hendrerit pellentesque. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos hymenaeos. Morbi wisi. Etiam arcu mauris, facilisis sed, eleifend non, nonummy ut, pede. Cras ut lacus tempor metus mollis placerat. Vivamus eu tortor vel metus interdum malesuada.