

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA



Dissertação

**SELEÇÃO DIVERSIFICADORA EM *Corynebacterium
pseudotuberculosis***

DISCENTE: Alessandra Lima da Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

CO-ORIENTADOR: Dr. Marcus Vinicius Canário Viana

BELO HORIZONTE

Julho – 2018

Alessandra Lima da Silva

**SELEÇÃO DIVERSIFICADORA EM *Corynebacterium*
*Pseudotuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Bioinformática.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

CO-ORIENTADOR: Dr. Marcus Vinicius Canário Viana

BELO HORIZONTE

Julho – 2018



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Alessandra Lima da Silva

48/2018

entrada

2º/2016

CPF:

051.816.555-80

Às quatorze horas do dia **30 de julho de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Seleção Diversificadora em *Corynebacterium Pseudotuberculosis***", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Bioinformática**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.141.225-48	APROVADA
Dr. Marcus Vinicius Canário Viana	UFMG	07473426605	APROVADA
Dr. Aristóteles Góes Neto	UFMG	5411318250	APROVADO
Dra. Anne Cybelle Pinto Gomide	UFMG	00123274680	APROVADA
Dr. Rodrigo Bentes Kato	UFMG	906.341.97200	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de julho de 2018.

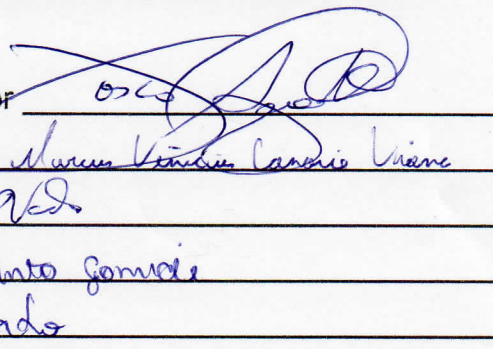
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador

Dr. Marcus Vinicius Canário Viana - Coorientador

Dr. Aristóteles Góes Neto

Dra. Anne Cybelle Pinto Gomide

Dr. Rodrigo Bentes Kato



Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Givaldete e José Cícero, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho. Valeu a pena toda distância, todo sofrimento e todas as renúncias. Também ao meu fiel companheiro de longa data Lucas Emmanuel, o meu Bem, sempre servindo como um alicerce e não me deixando desistir em dias ruins.

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Na realização da presente dissertação, contei com o apoio direto ou indireto de múltiplas pessoas às quais estou profundamente grata. Gostaria de agradecer aos meus pais Alexandre e Gil, meus irmãos Daniel e Isaque, meu Bem companheiro de longa data, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas, momentos de afastamento e reclusão, sempre estando presentes no meu dia a dia, me dando todo o amparo necessário para continuar e seguir com meus objetivos.

Ao orientador desta dissertação, o Prof. Dr. Vasco Azevedo, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui, lhe exprimo a minha gratidão.

Ao co-orientador, Dr. Marcus Vinícius Canário Viana, pela sua disponibilidade me ensinando cada passo realizado nesta dissertação, pelo seu incentivo e suporte na elaboração deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer à minha família LGCM, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de todo o meu mestrado, bem como, à elaboração da presente dissertação fazendo sempre boas sugestões para o enriquecimento do trabalho.

A todos os amigos e colegas pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos mais difíceis. Para não correr o risco de não citar algum, não vou identificar ninguém, pois aqueles a quem este agradecimento se dirige sabê-lo-ão desde já os meus agradecimentos.

Enfim, quero demonstrar toda a minha gratidão, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização da presente dissertação.

May the force be with you!

Sumário

Siglas.....	i
Resumo.....	1
Abstract	2
I. Apresentação	3
I.1 Pesquisa genômica de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	4
I.2 Colaboradores	4
I.3 Estrutura da dissertação	4
II. Introdução Geral	3
II.1 Biologia de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	7
II.1.1 Taxonomia	7
II.1.2 Microbiologia	7
II.1.3 Biovar Ovis e Equi	7
II.1.4 Fatores de virulência	8
II.1.5 Impacto econômico e dificuldades no controle	8
II.2 Genômica comparativa	9
II.2.1. Variação e adaptação do genoma	9
II.2.2 Pangenômica	9
II.2.3 Filogenômica	10
II.2.4 Análise de seleção positiva.....	11
II.2.5 Genômica estrutural e funcional de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	12
III. Objetivos	14
III.1 Objetivo geral	15
III.2 Objetivos específicos	15
IV. Artigo.....	15
VI. Conclusão e Perspectivas	38
VII. Referências.....	40
VIII. Anexo	51
Congressos, cursos nacionais e internacionais, apresentação de pôsters.....	51

Siglas

AA	Aminoácido
AQUACEN	Laboratório Oficial Central do Ministério da Pesca e Aquicultura
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BRIG	<i>Blast Ring Image Generator</i>
BLASTp	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – proteína
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDS	Sequência codificante
CLA	Linfadenite Caseosa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cp	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
G+C	Guanina + Citosina
LGCM	Laboratório de Genética Celular e Molecular
LBMCF	Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OSD	<i>Oedematous skin disease</i>
PAI	Ilha de Patogenicidade
PATRIC	<i>Pathosystems Resource Integration Center</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva e intracelular facultativa de importância médica e veterinária, e distribuição global. A espécie infecta uma variedade de mamíferos, como ovelhas, cabras, cavalos, búfalos e humanos, e causa perdas econômicas na produção animal. O biovar Equi é nitrato positivo e tem o cavalo e o búfalo como hospedeiros exclusivos. O biovar Ovis é nitrato negativo e tem preferência por ovinos e caprinos. Os tratamentos com antibióticos vêm perdendo eficácia, devido à proteção proporcionada pelos abscessos, e as vacinas atuais apresentam eficiência de proteção diferente em diferentes hospedeiros. A análise de seleção positiva (diversificadora) é útil para identificar mutações adaptativas neste patógeno e revelar mecanismos de adaptação ao hospedeiro e prováveis alvos para métodos de controle. Uma análise de seleção positiva em escala genômica foi realizada em *C. pseudotuberculosis* usando 29 linhagens de diferentes hospedeiros, biovars e países. A análise filogenômica sugeriu que Ovis divergiu a partir do biovar Equi, provavelmente depois da especialização para um subconjunto de hospedeiros. A seleção positiva foi detectada em 11 genes, a maior parte envolvida em processos de colonização de hospedeiro. Os resultados fornecem informações sobre as mutações adaptativas relacionadas ao estilo de vida da espécie e sugerem um provável alvo de droga.

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive, facultative intracellular bacterium with veterinary and medical importance and a global distribution. It infects a variety of mammals, such as sheep, goats, horses, buffalo and humans, and causes economic losses in animal production. Biovar Equi is nitrate positive and has horse and buffalo as exclusive hosts. Biovar Ovis is nitrate negative and has preference for sheep and goats. Antibiotic treatments have reduced efficiency due to the protection provided by the abscesses and current vaccines have different protection efficiency in different hosts. The analysis of positive (diversifying) selection is useful to identify adaptive mutations in this pathogen and to reveal mechanisms of host adaptation and probable targets for control methods. A genome-scale positive selection analysis was performed in *C. pseudotuberculosis* using 29 strains from different hosts, biovars and countries. The phylogenomic analysis suggested that Ovis diverged recently from Equi biovar, probably after specialization for a new host range. Positive selection was detected in 11 genes, most involved in host colonization processes. The results provide information about the adaptive mutations related to the species lifestyle and suggest a probable drug target.

I. Apresentação

I.1 Pesquisa genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Por meio da genômica estrutural e funcional, o Laboratório de Genética Celular e Molecular – LGCM e colaboradores vêm estudando o mecanismo patogênico, diagnóstico e vacinas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sendo a linhagem 1002 biovar Ovis o primeiro genoma completo sequenciado pelo nosso grupo, isolado de caprino, submetido em 2009. Na medida em que o grupo tem feito análises comparativas, tem-se identificado fatores de virulência, ilhas de patogenicidade, predições de marcadores de vacina (BARAÚNA *et al.*, 2017; RUIZ *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013a, 2013b) e genes envolvidos na resposta ao estresse (PINTO *et al.*, 2014). Logo, a medida que mais genomas são sequenciados, mais podemos compreender sobre o comportamento genômico da espécie. Até junho de 2018, 79 genomas desta espécie estão disponíveis no GenBank, sendo 73 depositados pelo grupo de pesquisa e colaboradores.

I.2 Colaboradores

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com colaboração entre os seguintes pesquisadores em ordem alfabética:

Dr. Alice Rebecca Wattam, Pesquisadora do Instituto de Biocomplexidade - Virginia Tech, USA;

Dr. Henrique Figueiredo, Pesquisador e Professor AQUACEN - UFMG, Brazil;

Dr. Vasco Azevedo, Pesquisador e Professor do LGCM - UFMG, Brazil.

O trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

I.3 Estrutura da dissertação

Este manuscrito é dividido em introdução geral, um artigo de pesquisa, considerações finais e perspectivas.

- a. A primeira parte aborda uma introdução geral, onde são mencionadas as características de *C. pseudotuberculosis*, tais como: taxonomia, microbiologia, impacto econômico e recentes estudos genômicos da espécie;

- b. A segunda parte apresenta um artigo sobre a análise de genes sob seleção positiva em 29 genomas de *C. pseudotuberculosis*;
- c. Por conseguinte, a terceira parte apresenta as conclusões e perspectivas deste trabalho;
- d. A seção de anexo contém trabalhos desenvolvidos durante o mestrado, como certificado de cursos, eventos, apresentação de pôster, organização de cursos de verão e eventos internacionais.

II. Introdução Geral

II.1 Biologia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

II.1.1 Taxonomia

A espécie pertence ao gênero *Corynebacterium*, um conjunto supragênico de Actinomicetos, que juntamente com *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, formam o grupo CMNR. Este grupo contém espécies de importância médica, veterinária e biotecnológica, tendo em comum características que incluem: alto conteúdo G+C e uma parede celular composta principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos (DORELLA *et al.*, 2006). O gênero *Corynebacterium* é composto por espécies patogênicas, oportunistas e não-patogênicas, como *C. diphtheria*, *C. jeikeium* e *C. glutamicum*, respectivamente (CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003; IKEDA; NAKAGAWA, 2003; SING *et al.*, 2015; TAUCH *et al.*, 2005). Análises filogenômicas mostraram que *C. pseudotuberculosis* comparado a *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* formam um cluster, sendo *C. diphtheriae* o grupo mais externo (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2005; SOARES *et al.*, 2013b; TAKAHASHI *et al.*, 1997).

II.1.2 Microbiologia

A espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva e um patógeno intracelular facultativo, que apresenta pleomorfismo celular, na forma de cocos ou bacilos, com tamanho de $0.5\text{--}0.6 \times 1.0\text{--}3.0 \mu\text{m}$. Não produz esporulação, não é capsulado, não apresenta motilidade e contém fimbrias. No meio de cultura ágar sangue apresentam-se colônias opacas e convexas, na cor branca-amarelada em uma superfície fosca. É positiva para glicose, frutose, galactose, manose e maltose. As paredes celulares contêm arabinose, galactose, glicose, manose, ácido meso-diaminopimélico e ácidos micólicos (BERNARD; FUNKE, 2015).

II.1.3 Biovar Ovis e Equi

Atualmente considera-se que a espécie *C. pseudotuberculosis* se subdivide em dois biovars: Ovis e Equi, sendo nitrato negativo e nitrato positivo, respectivamente (GUEDES *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2013a). Biovar Ovis causa linfadenite caseosa (CLA) em caprinos e ovinos (BAIRD; FONTAINE, 2007), mastite e lesões granulomatosas ulcerativas em bovinos (YERUHAM *et al.*, 2004) e linfadenite em camelos (HAWARI, 2008b). Em humanos causa linfadenite e pneumonia e a infecção está associada à exposição ocupacional ou consumo de produtos contaminados (HEGGELUND *et al.*, 2015; PEEL *et al.*, 1997). Biovar Equi causa lesão granulomatosa ulcerativa em gado (YERUHAM *et al.*, 1996, 2004). Em cavalos, causa linfangite ulcerativa nos membros, abscessos externos no peito (febre do pombo) e pode afetar órgãos internos (BARAÚNA *et al.*, 2017; FOLEY *et al.*, 2004; SPIER; AZEVEDO, 2016). Em búfalos, a infecção causa a doença da pele endematosa (OSD), porém é endêmica do

Egito (HUSSEIN, 2012; SELIM, 2001), e aumento dos nódulos linfáticos cervicais superficiais em camelos (TEJEDOR-JUNCO *et al.*, 2008). O biovar Equi possui dois prováveis hospedeiros exclusivos, o cavalo e o búfalo, em que a infecção por biovar Ovis não foi descrita (MOUSSA *et al.*, 2016).

II.1.4 Fatores de virulência

Um patógeno necessita de estruturas, produtos, estratégias de sobrevivência intra/extracelular e reprodução que incluem adesão, invasão, aquisição de nutrientes, competição e evasão do sistema imune (WEBB; KAHLER, 2008). Fatores de nicho conferem adaptações gerais a um nicho ecológico e estão presentes em bactérias com diferentes estilos de vida, patogênicas ou não patogênicas. Entretanto, fatores de virulência se diferenciam por terem como função exclusiva auxiliar o patógeno causando dano ao hospedeiro (HILL, 2012; TAUCH; BURKOVSKI, 2015).

Fatores de nicho/virulência foram descritos em *C. pseudotuberculosis*. Os ácidos micólicos da parede celular causam lesão dermonecrótica, sendo esses lipídios tóxicos para os macrófagos e permitindo a sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro (CARNE; WICKHAM; KATER, 1956; HARD, 1975). Outro exemplo, temos os Pili (YANAGAWA; HONDA, 1976), que são estruturas de adesão e desempenham um papel importante no início da invasão e na proliferação extracelular e intracelular (MANDLIK *et al.*, 2008; YANAGAWA; HONDA, 1976). Além disso, algumas proteínas secretadas atuam como toxinas. Um fator bem descrito na espécie é a enzima fosfolipase D, que atua na disseminação da bactéria, promovendo a hidrólise e degradação na esfingomielina em células endoteliais e aumentando a permeabilidade vascular, de modo que desempenha um papel importante na morte de macrófagos (D'AFONSECA *et al.*, 2008; MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007). Outra proteína, a toxina diftérica encontrada em isolados de *C. pseudotuberculosis* em búfalo (SELIM *et al.*, 2015), leva à inativação da síntese da proteína hospedeira e é adquirida por meio de uma conversão lisogênica durante uma infecção por um fago β (HOLMES, 2000).

II.1.5 Impacto econômico e dificuldades no controle

A *C. pseudotuberculosis* possui uma distribuição global, sendo encontrada na Europa, Austrália, América do Norte e do Sul, África e no Oriente Médio, a infecção causa impacto econômico principalmente para ovinocaprinocultura (BAIRD; FONTAINE, 2007).

A transmissão pode ocorrer por: contato entre animais (YERUHAM *et al.*, 2004), procedimentos de manejo, como tosa, castração e marcação auricular dos animais (WILLIAMSON, 2001); e moscas hematófagas (BARBA *et al.*, 2015; BRAVERMAN *et al.*,

1999; GHONEIM *et al.*, 2001). Foi descrito na literatura que a bactéria pode sobreviver por até 8 meses no solo (BAIRD; FONTAINE, 2007) e 55 dias em fômites (AUGUSTINE; RENSHAW, 1986). A bactéria possui baixas taxas de detecção (YERUHAM *et al.*, 2004) e o tratamento com antibióticos possui a eficácia reduzida devido à formação de abscessos e ao estilo de vida intra-macrofágico (COLLETT; BATH; CAMERON, 1994). Foram listadas 39 estratégias contra *C. pseudotuberculosis*, como bactérias geneticamente modificadas, vacinas atenuadas, antígenos recombinantes e alguns candidatos a componente para produção de vacina. Apesar do conhecimento atual, uma vacina e um método de diagnóstico satisfatórios ainda não foram desenvolvidos (LOPES BASTOS, 2012). Sendo assim, todos esses fatores contribuem para a persistência e disseminação do patógeno e justificam novas pesquisas para o desenvolvimento de métodos de controle.

II.2 Genômica comparativa

II.2.1. Variação e adaptação do genoma

O sequenciamento do genoma bacteriano aumentou significativamente o conhecimento de sua estrutura, função, variação e sua relação com os mecanismos genéticos envolvidos na relação entre patógeno e hospedeiro (LAND *et al.*, 2015; LOMAN; PALLEN, 2015). O genoma bacteriano é um mosaico de regiões estáveis e instáveis. A variação na estrutura do genoma, ou plasticidade genômica, se deve a processos de aquisição (inserção) e perda (deleção) de sequências, além de duplicações, inversões e translocações (PATEL, 2016). Mutações nas sequências codificantes ou genes adquiridos por transferência horizontal podem fornecer adaptações que permitem ao organismo adquirir novas estratégias de sobrevivência, podendo levar à formação de uma nova espécie por divergência adaptativa (HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017; LASSALLE; MULLER; NESME, 2015; VOS, 2011). O tamanho do genoma e estilo de vida estão diretamente relacionados, com bactérias de vida livre e parasitas extracelulares tendo um maior genoma. O genoma tem a tendência à redução, durante a evolução, para parasita intracelular facultativo, obrigatório, mutualista intracelular obrigatório e organela. Isto se deve à tendência de perda de genes envolvidos na síntese de metabólitos que são providos pela célula hospedeira (TOFT; ANDERSSON, 2010).

II.2.2 Pangenômica

A identificação das relações de homologia, ou ancestralidade comum, entre genes é necessária para estudos comparativos e evolutivos (HAGGERTY *et al.*, 2014). Genes ortólogos são genes transmitidos verticalmente, genes parálogos resultam de duplicação em

um mesmo genoma e genes xenólogos são adquiridos por transferência horizontal (KOONIN, 2005). Diferentes métodos são usados para identificar a homologia dos genes, geralmente a partir do alinhamento de sequências proteicas (ALTENHOFF; DESSIMOZ, 2009; CHEN *et al.*, 2007; PEARSON, 2013). São realizadas comparações *all-vs-all* (BLASTp) com algoritmos que buscam o melhor *hit* bidirecional (BBH - *Bidirectional Best Hits*), analisando a identidade e cobertura entre os genomas (WOLF; KOONIN, 2012). Uma forma de refinar mais esses dados é a utilização de Algoritmo de Clusterização de Markov para a diferenciação de genes ortólogos e parálogos (LI; STOECKERT; ROOS, 2003).

A análise da distribuição de genes entre diferentes genomas permite detectar eventos de plasticidade genômica que podem estar relacionados às adaptações do patógeno e que podem ter aplicação em seu controle. O pangenoma é o repertório completo de genes de uma espécie. O genoma *core* é um conjunto de genes compartilhados por todos os genomas, contendo genes essenciais que podem ser alvos de vacinas e drogas. O genoma acessório contém genes presentes em mais de um genoma, mas não em todos, podendo conter genes relacionados à adaptações ao ambiente e com aplicação no diagnóstico de grupos de linhagens de interesse (MEDINI *et al.*, 2005; TETTELIN *et al.*, 2008).

II.2.3 Filogenômica

A filogenética é o estudo das relações evolucionárias entre espécies (CHOUDHURI, 2014). A filogenômica é o estudo destas relações baseado na comparação de dados em escala genômica (CHAN; RAGAN, 2013). Estas relações são representadas por um diagrama ramificado, ou árvore. Os nós representam os ancestrais hipotéticos, os ramos representam o tempo de divergência, e os nós terminais (ou folhas) representam as unidades taxonômicas operacionais (OTU). Caso o nó que representa o ancestral comum de todas as OTUs seja conhecido, a árvore é enraizada. Um grupo composto de um ancestral e todos os seus descendentes forma um clado, ou grupo monofilético. Um grupo que não contém todos os descendentes é um grupo parafilético (CHOUDHURI, 2014). Um cladograma representa apenas a topologia da árvore, enquanto um filograma representa a distância genética pelo comprimento dos ramos (CHOUDHURI, 2014).

A filogenia pode ser reconstruída por métodos baseados em distância ou caractere. Nos métodos baseados em distância, como o *neighbour joining*, a distância entre cada par de sequência em uma matriz é calculada e os valores são utilizados para reconstruir a árvore. Nos métodos baseados em caractere, todas as sequências em um alinhamento são comparadas simultaneamente, um caractere por vez. Exemplos destes métodos são Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana (YANG; RANNALA, 2012). Análises filogenéticas e

filogenômicas possuem aplicações em questões biológicas, como relações entre espécies ou genes, origem e dispersão de patógenos (YANG; RANNALA, 2012).

II.2.4 Análise de seleção positiva

Os alelos com mutações adaptativas aumentam de frequência em uma população em um processo chamado seleção positiva, ou seleção adaptativa. A seleção negativa, ou purificadora, é o processo de redução na frequência de alelos com mutações deletérias. Alelos com mutações que não interferem na adaptabilidade do indivíduo têm sua frequência alterada ao acaso, evidenciando uma evolução neutra (CASILLAS; BARBADILLA, 2017; KIMURA, 1968). A identificação de genes sob seleção pode ter aplicações para estudos sobre: evolução, ecologia e taxonomia (KOPAC *et al.*, 2014; VOS, 2011), desenvolvimento de métodos de controle de patógenos (WANG *et al.*, 2017), e geração de hipóteses para estudos sobre função de genes (ANISIMOVA; BIELAWSKI; YANG, 2002; YANG; DOS REIS, 2011).

Em nível molecular, a seleção pode ser estimada por meio da análise de evolução de sequências codificadoras de proteínas. Uma substituição de nucleotídeo que altera o aminoácido é chamada de não-sinônima (dN), enquanto uma substituição que não altera o aminoácido é chamada de sinônima (dS). A utilização de modelos estatísticos de substituição de códons permite identificar a ocorrência de seleção por meio da proporção entre a taxa de mutação não-sinônima (dN) por sinônima (dS), utilizando a equação $\omega = dN / dS$. Um excesso de substituições não-sinônimas, representado por $\omega > 1$, indica seleção positiva, ou seja, a substituição de aminoácidos foi fixada. Seleção negativa (ou purificadora) é identificada quando $\omega < 1$, indicando que a maior parte das substituições de aminoácidos foi eliminada. Um valor de $\omega = 1$ indica evolução neutra (GOLDMAN; YANG, 1994). Após o alinhamento das sequências em nível de códon, os modelos estatísticos iniciais calcularam um valor de ω médio para todos as posições de códons (*sites*) (GOLDMAN; YANG, 1994). Como poucos resíduos estão envolvidos na adaptação de uma proteína, o valor médio de ω raramente é maior que um. Modelos que permitem ω variar por códon foram desenvolvidos (NIELSEN; YANG, 1998).

Nas análises de seleção positiva, um modelo neutro que não permite seleção positiva ($\omega < 1$ ou $\omega = 1$) é comparado a um modelo que permite seleção positiva ($\omega > 1$, $\omega = 1$ e $\omega < 1$). A probabilidade de cada modelo é comparada com um teste de razão de verossimilhança. Para cada *site* identificado sob seleção positiva ($p < 0,05$), uma estatística Bayesiana é aplicada para calcular a probabilidade posterior (YANG *et al.*, 2000). Os modelos *site* calculam ω para cada posição do alinhamento. Os pares de modelos nulo e de seleção mais eficientes são M1a/M2a e M7/M8 (Tabela 1) (YANG *et al.*, 2000). Os testes que utilizam estes

modelos identificam adaptações em genes que estão continuamente sob seleção positiva, como os envolvidos na corrida armamentista entre patógeno e hospedeiro (STUDER; ROBINSON-RECHAVI, 2009). Os testes com modelos *branch-site* identificam seleção positiva em *sites* de um grupo específico de uma filogenia, revelando suas adaptações exclusivas. O valor de ω para grupo de interesse (*foreground*) é comparado com o valor de ω dos demais grupos (*background*). O modelo neutro não permite seleção positiva no grupo alvo ou nos demais, enquanto o modelo de seleção permite seleção positiva apenas no grupo alvo (YANG; NIELSEN, 2002; ZHANG, 2005).

Tabela 1 - Parâmetros dos modelos *site* para teste de seleção positiva

Modelos	Classes de ω	Proporção de <i>sites</i>	Referências
Neutro			
M1a	$\omega_0 < 1, \omega_1 = 1$	$p_0, (p_1 = 1 - p_0)$	(WONG, 2004; YANG, 2005)
M7	Beta(p, q)	$p_0(p, q)$	(YANG <i>et al.</i> , 2000)
Seleção			
M2a	$\omega_0 < 1, \omega_1 = 1, \omega_2 > 1$	$p_0, p_1, (p_2 = 1 - p_0 - p_1)$	(WONG, 2004; YANG, 2005)
M8	Beta, $\omega_s > 1$	$p_0, (p_1 = 1 - p_0)$	(YANG <i>et al.</i> , 2000)

II.2.5 Genômica estrutural e funcional de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A filogenômica do gênero *Corynebacterium* apresenta um cluster de espécies patogênicas e não patogênicas. Os patógenos *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* formam um cluster, onde *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* são mais próximas (SOARES *et al.*, 2013a). O biovar Ovis forma um grupo monofilético que se derivou do biovar Equi após especialização em parte dos hospedeiros originais (VIANA *et al.*, submetido). Isto explicaria o fato de este biovar não causar doença em búfalos após infecção experimental (MOUSSA *et al.*, 2016), ou de ainda não ter sido isolado de cavalos. Somente linhagens do biovar Equi foram sugeridas de se agruparem por hospedeiro (VIANA *et al.*, 2017).

Estudos de genômica comparativa revelaram 16 ilhas genômicas na espécie e que o biovar Equi possui maior plasticidade genética que o biovar Ovis. O primeiro apresenta entre 95 e 100% de identidade em seu genoma acessório, enquanto o segundo apresenta entre 99 e 100%. Entre as características exclusivas do biovar Equi estão uma região contendo genes envolvidos na respiração de nitrato e mutações nos dois clusters de genes de codificam os Pili *spaA* e *spaD* (RUIZ *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013b). Em relação à isolados de um mesmo hospedeiro, a comparação de isolados de cavalo não identificou diferenças genotípicas entre linhagens que causam três manifestações da doença: abscesso externo,

abscessos em órgãos internos e linfangite ulcerativa (BARAÚNA *et al.*, 2017). Um estudo dos isolados de búfalo identificou que suas linhagens são clonais e possuem uma inserção de 36.6Kb na ilha de patogenicidade PiCp12, que contém um profago *tox+*. Esta inserção é exclusiva de isolados deste hospedeiro e foi sugerida como um requisito para a sua infecção (VIANA *et al.*, 2017).

Para identificar genes expressos durante a infecção, estudos de transcriptoma identificaram genes diferencialmente expressos em condições que simulam o interior do hospedeiro e do macrófago, como estresse ácido, osmótico e térmico (GOMIDE *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2012, 2014). Análises do proteoma foram feitas para identificar a expressão diferencial em estresse nitrosativo (SILVA *et al.*, 2014), após a passagem em camundongos (SILVA *et al.*, 2017a, 2017b) e para identificação de alvos de drogas e vacinas (HASSAN *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2013a).

Os estudos genômicos anteriores tiveram o objetivo de correlacionar a presença e ausência de genes e sua expressão diferencial com a patogenicidade da espécie. Como estratégia complementar, a evolução das sequências dos genes pode ser estudada por meio da análise de seleção positiva com o objetivo de identificar mutações adaptativas relacionadas ao estilo de vida deste patógeno.

III. Objetivos

III.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação é identificar genes sob seleção positiva entre 29 genomas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de diferentes hospedeiros.

III.2 Objetivos específicos

- Gerar uma árvore filogenômica para obtenção de um maior número de representantes;
- Executar os *pipelines* de seleção positiva com modelos *site*;
- Realizar análise de enriquecimento dos genes identificados como sob seleção positiva;
- Identificar ilhas genômicas;
- Identificar as prováveis adaptações, relacionando-as com a evolução e virulência das espécies.

IV. Artigo

IV.1 Capítulo I. Identification of genes under diversifying selection in *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Alessandra Lima da Silva, Alice Rebecca Wattam, Artur Silva, Vasco Azevedo, Marcus Vinicius Canário Viana. **Editado de acordo com as normas da revista GENE.**

O objetivo principal deste trabalho foi identificar genes sob seleção positiva (diversificadora) em *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Uma análise em escala genômica foi realizada, utilizando 29 genomas representando diferentes biovars, hospedeiros e países. Foram identificados 11 genes sob seleção positiva, a maioria envolvida na colonização do hospedeiro, além de processos celulares como divisão e síntese da parede celular. A análise filogenômica sugeriu que *Ovis* se derivou do biovar Equi após especialização para um subconjunto de hospedeiros. Os resultados fornecem informações sobre as mutações adaptativas relacionadas ao estilo de vida da espécie e sugerem um provável alvo de droga.

1 **Identification of genes under diversifying selection in *Corynebacterium pseudotuberculosis***

2 Alessandra Lima da Silva^a, Alice Rebecca Wattam^b, Artur Silva^c, Vasco Azevedo^a, Marcus Vinicius
3 Canário Viana^{ac}.

4 ^aDepartamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas
5 Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

6 ^bBiocomplexity Institute of Virginia Tech, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, 24060, USA.

7 ^cDepartamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará,
8 66075-900, Brazil.

9

10 Corresponding author: canarioviana@gmail.com

11

12 Email addresses:

13 ALS: alessandralima92@gmail.com

14 ARW: rwattam@vt.edu

15 AS: arturluizdasilva@gmail.com

16 VA: vasco@icb.ufmg.br

17 MVCV: canarioviana@gmail.com

18 Abstract

19 We provide an analysis of the selective pressure on genes from 29 *Corynebacterium*
20 *pseudotuberculosis* genomes that were isolated from different hosts, including representatives of both Ovis
21 and Equi biovars. Using a genome scale positive selection pipeline, we identified 11 genes under positive
22 (diversifying) selection in genes related to adhesion, nutrient acquisition, gene regulation, cell division, cell
23 wall biosynthesis, translation, host immune system evasion and drug resistance. These genes are involved
24 in host colonization processes and are under rapid evolution. The results provide information about the
25 selective pressures that lead the evolution of *C. pseudotuberculosis* and suggests probable drug targets.

26

27 Keywords: Positive selection, genomics, *Corynebacterium pseudotuberculosis*

28

29 1. Introduction

30 The availability of complete genome sequences of many individuals allows the analysis of genome-
31 wide DNA variation and the correlation of a specific genotype and its fitness due to selection (SHEPPARD;
32 GUTTMAN; FITZGERALD, 2018). Positive (diversifying or adaptive) selection increases the frequency
33 of adaptive mutations, while negative (or purifying) selection decreases the frequency of deleterious
34 mutations (CASILLAS; BARBADILLA, 2017). The evolution of protein coding genes is analyzed by
35 codon substitution models that provide a measure of selective pressure by estimating the proportion of non-
36 synonymous (d_N) to synonymous (d_S) substitution, as $\omega = d_N / d_S$. A proportion of $\omega > 1$, $\omega < 1$ or $\omega = 1$ are
37 interpreted as positive selection, negative selection or neutral evolution. The inference of positive selection
38 is calculated using a likelihood ratio test to compare the likelihood of a general statistical model that allows
39 positive selection and a model that does not. A few sites (amino acids) are involved in adaptation, statistical
40 models were developed to allow ω to vary among sites (codons) (YANG *et al.*, 2000). The site models
41 allow variation of ω among sites (YANG *et al.*, 2000) and are suitable for detecting in specific amino acid
42 positions that are continuously under positive selection, as the ones involved in the arms race between host
43 and parasites (STUDER; ROBINSON-RECHAVI, 2009). The branch-site models allow variation of ω
44 among sites and lineage (YANG; NIELSEN, 2002; ZHANG, 2005) and are suitable to detect selection that
45 happened in a specific lineages and fine-tuned a protein (STUDER; ROBINSON-RECHAVI, 2009). In
46 bacteria, the application of positive selection tests have been used to identify mutations in genes involved
47 in bacterial speciation (KOPAC *et al.*, 2014), host-pathogen interactions (HONGO *et al.*, 2015), and the
48 development of drugs (WANG *et al.*, 2017).

49 *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive facultative intracellular bacterium with
 50 veterinary and medical relevance and global distribution (BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA *et al.*,
 51 2006). Two biovars were described according to serology, nitrate reduction and molecular markers
 52 (BARAKAT *et al.*, 1984; BIBERSTEIN; KNIGHT; JANG, 1971). Biovar Ovis is nitrate negative, causes
 53 Caseous Lymphadenitis in sheep and goats and can also infect humans (HEGGELUND *et al.*, 2015). Biovar
 54 Equi is nitrate positive and causes ulcerative lymphangitis in horses (SPIER; AZEVEDO, 2016) and
 55 Oedematous Skin Disease in buffalo (SELIM, 2001). Cow and camels can be infected by both biovars
 56 (HAWARI, 2008a; TEJEDOR-JUNCO *et al.*, 2008; YERUHAM *et al.*, 2004). Low detection rates,
 57 inefficacy of antibiotic therapies and variations in the effectiveness of vaccines for different hosts contribute
 58 to the difficulties of the pathogen control and require more studies about the genes involved in its lifestyle
 59 (LOPES BASTOS, 2012). Although studies of pangenome, transcriptome and proteome were performed in
 60 this species (GOMIDE *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017a; VIANA *et al.*, 2017), but no positive selection
 61 analysis was done yet.

62 In this work, we used positive selection analysis using site models to identify genes under continuous
 63 positive selection in *C. pseudotuberculosis*. Those genes are under rapid evolution due to the interactions
 64 with the hosts and the environment, and their identification would contribute to understanding of the species
 65 lifestyle and control methods.

66

67 2. Material and Methods

68 2.1. Genome annotation, phylogeny and pathogenicity island prediction

69 Genomes of 29 *C. pseudotuberculosis* strains from different hosts and biovars (Table 1) were
 70 annotated using RASTtk (BRETTIN *et al.*, 2015), which is part of the Pathosystem Resource Integration
 71 Center (PATRIC) (WATTAM *et al.*, 2017). A phylogenomic tree was reconstructed using PEPR v.3
 72 (Phylogenomic Estimation with Progressive Refinement) program (<https://github.com/enordber/pepr.git>).
 73 Pathogenicity islands were predicted using GIPSY (SOARES *et al.*, 2016), using *C. glutamicum* ATCC1302
 74 genome (NC_006958.1) as the non-pathogenic reference. Blast Ring Image Generator (BRIG) (ALIKHAN
 75 *et al.*, 2011) was used to generate circular maps.

Table 1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomes used for positive selection analysis

Strain	Biovar	Host	Country	Access no
258	Equi	Horse	Belgium	CP003540.2
MB14	Equi	Horse	USA	CP013261.1
E19	Equi	Horse	Chile	CP003540.2
MEX30	Equi	Horse	Mexico	CP017291.1

CIP52.97	Equi	Horse	Kenya	CP003061.2
31	Equi	Buffalo	Egypt	CP003421.3
32	Equi	Buffalo	Egypt	CP015183.1
33	Equi	Buffalo	Egypt	CP015184.1
36	Equi	Buffalo	Egypt	CP015186.1
48	Equi	Buffalo	Egypt	CP015191.1
162	Equi	Camel	UK	CP013260.2
262	Equi	Cow	Belgium	CP012022.1
I37	Equi	Cow	Israel	CP017384.1
I19	Ovis	Cow	Israel	CP002251.1
29156	Ovis	Cow	Israel	CP010795.1
E56	Ovis	Sheep	Egypt	CP013699.1
PA01	Ovis	Sheep	Brazil	CP013327.1
C231	Ovis	Sheep	Australia	CP001829.1
MEX25	Ovis	Sheep	Mexico	CP013697.1
N1	Ovis	Sheep	Equatorial Guinea	CP013146.1
1002B	Ovis	Goat	Brazil	CP012837.1
VD57	Ovis	Goat	Brazil	CP009927.1
PO222/4-1	Ovis	Goat	Portugal	CP013698.1
MEX1	Ovis	Goat	Mexico	CP017711.1
MEX9	Ovis	Goat	Mexico	CP014543.1
P54B96	Ovis	Wildebeest	South Africa	CP003385.1
267	Ovis	Llama	USA	CP003407.1
48252	Ovis	Human	Norway	CP008922.1
FRC41	Ovis	Human	France	CP002097.1

76

77 2.2. Genome scale positive selection analysis

78 Positive selection analysis using site models (YANG *et al.*, 2000) in genome scale was performed
79 using the pipeline POTION v1.1.2 (HONGO *et al.*, 2015). The script `extract_aa_nt_from_gb.pl` from
80 POTION pipeline is used to extract nucleotide and amino acid from each protein-coding sequence in a
81 GenBank file and format their sequence IDs. For each input file, it creates two multi-fasta files, one
82 containing nucleotide and other amino acid sequences, and a third file containing the protein ID from the
83 GenBank file and its respective formatted ID. A modified version of the script
84 `extract_aa_nt_from_gb_rast.pl` (S1 File) was used to change IDs from RASTtk annotation to a suitable
85 format (RASTtk-based IDs) for POTION pipeline. The input files are provided in S2 File. The gene
86 homology was predicted using the amino acid sequence files as input for FastOrtho
87 (https://github.com/grovesdixon/using_FastOrtho), an implementation of OrthoMCL (LI; STOECKERT;

88 ROOS, 2003) in Java, using default parameters. The output file contained gene homology information in
89 OrthoMCL 1.4 format.

90 The nucleotide sequence and the gene homology file were used as input for POTION. As a sequence
91 filtering step, we included only sequences between 150 and 100,000 nucleotides in length, with a relative
92 size between 0.8 and 1.2 of the orthologous group median, valid start and stop codons, and containing only
93 standard nucleotides (A, T, G, C). In addition, nucleotide sequence sizes must be a multiple of three, to
94 match the length of a codon. We included only orthologous genes that had amino acid sequences and
95 groups with mean identity between 50 and 100%, and at least four genomes and sequences per group.
96 Groups that had some sequences excluded by previous filtering steps, but met other requirements, were still
97 included. No anchor genome was used.

98 The groups that remained following the filtering criteria were then analyzed using the POTION
99 pipeline. The steps of analysis included multiple protein sequence alignment, protein-guided codon
100 alignment, sequence trimming, recombination detection filtering, phylogenetic tree reconstruction and
101 positive selection detection. Multiple protein sequence alignment was performed by MUSCLE v3.8.31
102 (EDGAR, 2004). Protein guided codon alignments were produced using a POTION internal subroutine.
103 Alignment trimming was done by trimAl v1.2 (CAPELLA-GUTIÉRREZ; SILLA-MARTÍNEZ;
104 GABALDÓN, 2009). A recombination detection filtering step was used to remove groups that had evidence
105 of recombination detected by at least two of tree recombination tests in PhiPack version 1.0 (BRUEN;
106 PHILIPPE; BRYANT, 2006) (Phi, NSS and MaxChi2, Phi being mandatory). The *p*-value of each
107 recombination test was set to 0.05 and Type I errors were control by setting the *q*-value for multi-test
108 correction at 0.1 (XU; CHEN; ZHOU, 2011). The *q*-values for the recombination detection multi-test were
109 calculated using the *qvalue()* method (STOREY; TIBSHIRANI, 2003), which implements the Statistics:
110 Multitest Perl module. Phylogenetic trees were created for each gene, using the dnaml program of PHYLIP
111 v3.695 package (RETIEF, 2000), using fast mode and bootstrap value of 100.

112 Positive selection analysis was done using site-model analysis implemented in the codeml program
113 of PAML v4.8 (YANG, 2007). The log likelihood of codon evolution models that don't allow positive
114 selection (M1a, M7) are compared with others that permit it (M2a and M8a). Twice the log likelihood
115 difference is compared with a χ^2 distribution with degrees of freedom equal to 2. The *p*-value and the
116 corrected *q*-value (calculated as for recombination detection) were calculated for each of the compared pair
117 of models (M1a/M2a, M7/M8). A Bayes empirical Bayes (BEB) was used to test the posterior probabilities
118 ($p > 95\%$) of the positive selected sites belonging to $\omega > 1$ class (YANG, 2005). A representative sequence
119 for each of the ortholog groups that had evidence of positive selection were analyzed for function and
120 presence of specific domains using the InterProScan Database

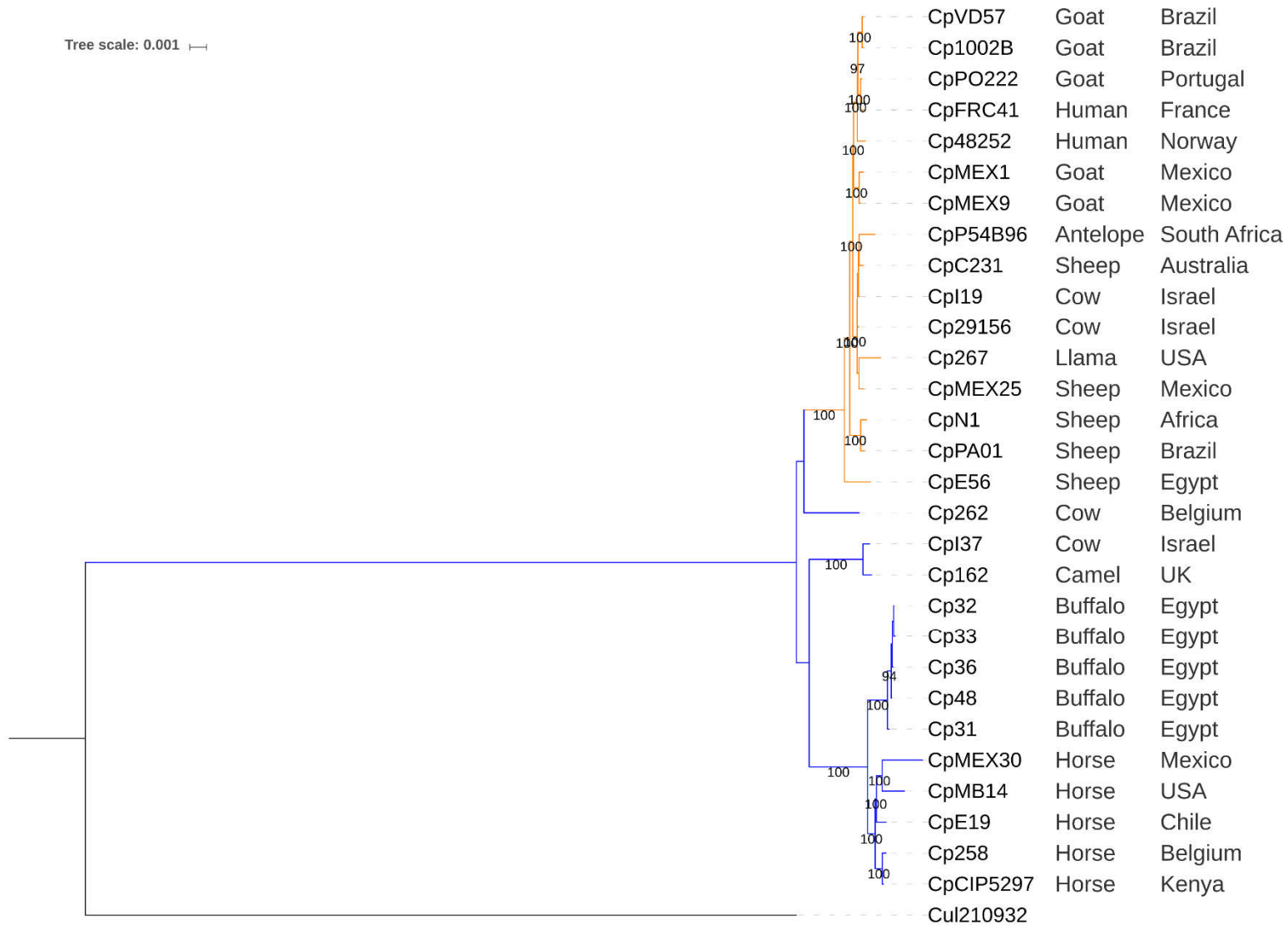
121 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>). For each identified codon, the respective amino
122 acid positions were visualized using Protter version 1.0 (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) (OMASITS *et*
123 *al.*, 2014).

124

125 **3. Results**

126 **3.1. Phylogenomic tree**

127 The phylogenomic tree shows two clusters representing the biovars with jackknife values of 100,
128 when biovar Equi strains from cow (262 and I37) and camel (162) are not considered. Those three were the
129 most external branches of Equi strains. Additionally, the Ovis strain from cow (I19, Israel) was clustered
130 within other strains of the same biovar, without any significant differentiation from them.



131

132 Fig. 1. Phylogenomic tree of 29 *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains, based on core proteome and progressive refinement using PEPR.

133 **3.2. Positive selection analysis**

134 FastOrtho predicted 2,618 groups of homologs (orthologs and paralogs) with two or more sequences.
135 After filtering steps, the POTION processed 2,144 valid ortholog groups, from which 23 were removed due
136 to evidence of recombination (Table 2). Detailed statistics of the filtering steps by genome are in
137 Supplementary Table S1. From the remaining 2,121 groups, only 18 (0.85%) were identified as undergoing
138 positive selection for at least one model, after correction for multiple testing ($p < 0.05$ and $q < 0.05$)
139 (Supplementary Table S2). After manual curation, seven genes were discarded as false positives caused by
140 frameshifts (Supplementary Table S3). Only 11 genes remained (0,52%), one in a pathogenicity island
141 (Table 3). The IDs of each sequence and its respective GenBank ID are provided in Supplementary Table
142 S4.

143

144 Table 2. Group of orthologous genes with evidence of recombination in *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Gene	Product (Pathogenicity Island)	Process	OrthoMCL group
<i>gldA</i>	Glycerol dehydrogenase	Metabolism	ORTHOMCL729
<i>murJ</i>	Proposed peptidoglycan lipid II flippase MurJ	Cell membrane biosynthesis	ORTHOMCL47
<i>tkt</i>	Transketolase	-	ORTHOMCL879
<i>echA</i>	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (Enoyl-CoA hydratase)	Metabolism	ORTHOMCL1850
<i>aceF</i>	Dihydrolipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	-	ORTHOMCL336
<i>nanH</i>	Sialidase	Metabolism	ORTHOMCL1133
<i>topA</i>	DNA topoisomerase I	DNA replication	ORTHOMCL1658
<i>srtA</i>	Sortase A, LPXTG specific (PiCp15)	-	ORTHOMCL1937
<i>rimJ</i>	Ribosomal-protein-S5p-alanine acetyltransferase	Translation	ORTHOMCL473
<i>infB</i>	Translation initiation factor 2	Translation	ORTHOMCL1004
<i>dppA</i>	Oligopeptide-binding protein	Transport	ORTHOMCL1189
<i>hemH</i>	Ferrochelatase, protoheme ferro-lyase	Transport	ORTHOMCL1046
-	Hypothetical protein (Htaa domain) (PiCp5)	Transport	ORTHOMCL143
-	Adhesin	Adhesion	ORTHOMCL69
-	Hypothetical protein	Unknown	ORTHOMCL1944
-	Hypothetical protein	Unknown	ORTHOMCL2242
-	Hypothetical protein (Immunoglobulin-like fold)	Unknown	ORTHOMCL1257
-	Hypothetical protein (secreted) (PiCp15)	Unknown	ORTHOMCL11
-	Hypothetical protein (secreted)	Unknown	ORTHOMCL51
-	Hypothetical protein (secreted)	Unknown	ORTHOMCL49

-	Hypothetical protein (thioester domain) (PiCp8)	Unknown	ORTHOMCL1644
-	Hypothetical protein (transmembrane)	Unknown	ORTHOMCL302
-	Secreted protein (transmembrane)	Unknown	ORTHOMCL906

145

146 Table 3. Genes identified as undergoing positive selection in *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Gene	Product (Pathogenicity Island)	Function	PS sites	PS sites location	Models	Genbank ID	OrthoMCL group
<i>putP</i>	Sodium/proline symporter	Transport	12	E, T, I	2a, 8	Cp162_0815	ORTHOMCL979
<i>mntB</i>	Manganese ABC transporter ATP-binding protein	Transport	2	I	2a, 8	Cp162_0441	ORTHOMCL550
-	EamA-like transporter family protein	Transport	12	E, T, I	2a, 8	Cp1002B_1042	ORTHOMCL1826
<i>uppP</i>	Undecaprenyl-diphosphatase	Cell-wall biosynthesis	8	E, T, I	2a, 8	Cp1002B_1609	ORTHOMCL1353
-	Alpha/beta hydrolase fold protein	-	9	I	2a, 8	Cp258_1503	ORTHOMCL644
-	Alpha/beta hydrolase family protein	-	2	I	2a	Cp1002B_0104	ORTHOMCL675
<i>pepC</i>	Aminopeptidase C	Metabolism	10	I	2a, 8	Cp162_0307	ORTHOMCL1914
<i>ftsK</i>	DNA translocase FtsK	Cell division	11	E, T, I	2a, 8	Cp1002B_1393	ORTHOMCL1061
-	Adhesin (PiCp4)	Adhesion	10	I	2a, 8	Cp29156_0959	ORTHOMCL2111
<i>ripA</i>	HTH-type transcriptional repressor of iron protein A	Gene regulation	3	I	2a, 8	Cp119_0717	ORTHOMCL730
<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	Translation	2	I	2a, 8	Cp1002B_0412	ORTHOMCL1347

147 PAI – Pathogenicity island, E – extracellular, T – transmembrane, I – intracellular

148 4. Discussion

149 4.1. Phylogenomic tree

150 This tree topology suggests that *Ovis* is a monophyletic group derived from an Equi ancestor
151 (Viana et al., submitted). Comparative genomics studies have investigated the differences between
152 biovars (ALMEIDA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2013b; VIANA *et al.*, 2017). The differences found
153 may be related to adaptations to a new host range change, in which the genome suffers sequence
154 acquisition, loss of redundant functions, recombination and positive selection (SHEPPARD;
155 GUTTMAN; FITZGERALD, 2018; TOFT; ANDERSSON, 2010). Divergence in adaptations can split
156 the population by ecological niches, represented here by the host ranges of each biovar. The coexistence
157 of the divergent population and its ancestor is more likely when the divergent one has exclusive
158 resources and the resources itself will coexist in the remote future. The genome plasticity and periodic
159 selection events involved in the specialization for each niche can lead to irreversible separation of these
160 population in two different species, that will be recognizable as sequence clusters for most genes after
161 they accumulate different neutral mutations (COHAN, 2017). It is possible that *Ovis* is a newly
162 divergent population due to the phylogenomic tree topology (Fig. 1), genomic divergence from Equi
163 (SOARES *et al.*, 2013b; VIANA *et al.*, 2017), more clonal population (SOARES *et al.*, 2013b; VIANA
164 *et al.*, 2017), and different host range (DORELLA *et al.*, 2006; MOUSSA *et al.*, 2016).

165

166 4.2. Positive selection analysis

167 The pipeline removed 23 of the valid 2,144 ortholog groups due to evidence of recombination.
168 Although recombination in one of the processes involved in the host adaptation (SHEPPARD;
169 GUTTMAN; FITZGERALD, 2018), it can cause false positive results for positive selection analysis
170 due to alignment of codons with different phylogenetic histories (ANISIMOVA; NIELSEN; YANG,
171 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2009). We detected positive selection in 11 genes that code membrane
172 proteins involved in transport and adhesion, as well as cytoplasmic proteins involved in metabolism,
173 cell division and gene regulation (Table 3, Supplementary Figs S1-11).

174

175 4.2.1. Membrane-associated proteins

176 Membrane proteins are in the interface between the bacteria and the environment. Positive
177 selection is commonly identified in those proteins due to adaptations involved in the arms race between
178 bacteria and other bacteria, phages and the host immune system (HONGO *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*,
179 2007). In this study, positive selection was detected in genes involved in the transport of manganese,
180 proline, drug and metabolites, and adhesion.

181 The gene *mntB* (ORTHOMCL550, Supplementary Fig. S1) codes the cytoplasmic ATP-binding
182 and catalytic subunit of a MntABCD manganese ABC transporter (TROST *et al.*, 2010). Manganese is

183 a required cofactor for all forms of life, important to oxidative stress response and necessary for
184 virulence in bacterial pathogens (JUTTUKONDA; SKAAR, 2015).

185 The *putP* gene (ORTHOMCL979, Supplementary Fig. S2) codes a high-affinity proline importer
186 from the sodium solute symporter family. Proline is a source of carbon and nitrogen and a moderately
187 effective osmoprotectant (MOSES *et al.*, 2012). *Staphylococcus aureus putP* mutants exhibited
188 significantly reduced virulence, suggesting this gene as a drug target (BAYER *et al.*, 1999). DMT
189 superfamily comprises a diversity of protein domain families with multiple functions including transport
190 of nucleotide sugars (JACK; YANG; H. SAIER, 2001; VÄSTERMARK *et al.*, 2011).

191 An adhesin (Supplementary Fig. S4) was detected in a region of the pathogenicity island PiCp4
192 exclusive of *Ovis* strains. Adhesion structures have been shown to be necessary for colonization of host
193 tissues (ROGERS; DAS; TON-THAT, 2011). The acquisition of this adhesion could be related to tissue
194 specific adhesion on *Ovis* hosts (MANDLIK *et al.*, 2007).

195 Within these membrane proteins, adaptive mutations are probably involved in cofactor
196 biosynthesis, oxidative stress response, nutrient acquisition, drug resistance and adhesion. All these
197 processes can be related to virulence. The Sodium/proline symporter (*putP*) and DMT are
198 transmembrane proteins with surface exposed positive selected sites. Amino acid changes in these sites
199 could be a mechanism that avoid binding by antibodies or phages, instead of an adaptation related to the
200 protein function (PETERSEN *et al.*, 2007).

201

202 4.2.2. Metabolism

203 The gene *pepC* (ORTHOMCL1914, Supplementary Fig. S5) encodes a cysteine aminopeptidase
204 that can also hydrolyze the anti-tumor glycopeptide bleomycin (MISTOU; GRIPON, 1998). In
205 *Leishmania*, cysteine peptidases are virulence factors that modulate the mammalian host's immune
206 response and facilitates survival and growth within the host macrophage (MOTTRAM; COOMBS;
207 ALEXANDER, 2004). The groups ORTHOMCL644 (Supplementary Fig. S6) and ORTHOMCL675
208 (Supplementary Fig. S7) are α/β -hydrolase fold family enzymes with unknown function. This family is
209 a group of structurally related enzymes with diverse catalytic functions (HOLMQUIST, 2000). Here,
210 adaptive mutations are probably associated to immune system evasion.

211

212 4.2.3. Other proteins

213 The FtsK protein (ORTHOMCL1061, Supplementary Fig. S8) is a DNA translocase that
214 coordinates chromosome unlinking and segregation, and cell division in bacteria
215 (BESPROZVANNAYA; BURTON, 2014; CROZAT; GRAINGE, 2010). The gene *uppP*
216 (ORTHOMCL1353, Supplementary Fig. S9) encodes the enzyme Undecaprenyl-diphosphatase, a

217 transmembrane protein related to bacterial cell-wall biosynthesis. This enzyme converts undecaprenyl
218 diphosphate (UPP) to undecaprenyl phosphate (UP), which acts as an essential lipid carrier across the
219 cytoplasmic membrane for peptidoglycan cell wall precursors (MANAT *et al.*, 2014). UppP and UP are
220 drug targets (WANG *et al.*, 2016).

221 The gene *rpsK* (ORTHOMCL1347, Supplementary Fig. S10) codes the ribosomal S11 protein of
222 the ribosome 30S subunit. It binds to the 5'-UTR region of mRNA and interacts to protein S7. Mutation
223 in this protein increased the ribosome capacity for frameshifting, read through of a nonsense codon and
224 codon misreading (ROBERT; BRAKIER-GINGRAS, 2003).

225 The gene *ripA* (ORTHOMCL730, Supplementary Fig. S11) encode a transcriptional regulator
226 assigned to the DtxR regulon, that represses genes coding for iron proteins under the limitation of this
227 metal (WENNERHOLD; KRUG; BOTT, 2005). It links the availability of iron with the expression of
228 genes in the citrate cycle, respiratory energy metabolism and oxidative stress response (TROST *et al.*,
229 2010).

230 Within these proteins, adaptive mutations are involved in cell division, cell wall biosynthesis,
231 translation, and regulation of genes related to metabolism and oxidative stress response. The
232 Undecaprenyl-diphosphatase is a transmembrane protein with surface exposed positive selected sites,
233 which could be a binding site of phages and antibodies (PETERSEN *et al.*, 2007).

234

235 **5. Conclusion**

236 A genome-scale positive selection analysis in *C. pseudotuberculosis* revealed genes under rapid
237 evolution, most of them related to host colonization. The results provide information about the selective
238 pressures that lead to the evolution of *C. pseudotuberculosis* and suggest probable drug targets.

239

240 **Competing interests**

241 The authors declare that there are no competing interests.

242

243 **Authors' contributions**

244 MVCV and ARW conceived the project. VA and AS acquired the funding. ALS and MVCV
245 performed the analysis. MVCV and VA supervised the project. ALS and MVCV wrote the manuscript.
246 All authors read and approved the final manuscript.

247

248 **Acknowledgements**

249 The authors thank the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico),
 250 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and Universidade Federal de
 251 Minas Gerais (UFMG) and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPQ-UFMG) for funding the study.

252

253 **6. References**

- 254 ALIKHAN, N.-F. *et al.* BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome
 255 comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, dez. 2011.
- 256 ALMEIDA, S. *et al.* Exploration of Nitrate Reductase Metabolic Pathway in *Corynebacterium*
 257 pseudotuberculosis. **International Journal of Genomics**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- 258 ALTENHOFF, A. M.; DESSIMOZ, C. Phylogenetic and functional assessment of orthologs inference
 259 projects and methods. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 1, 2009.
- 260 ANISIMOVA, M.; BIELAWSKI, J. P.; YANG, Z. Accuracy and Power of Bayes Prediction of Amino
 261 Acid Sites Under Positive Selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 6, p. 950–958, 2002.
- 262 ANISIMOVA, M.; NIELSEN, R.; YANG, Z. Effect of recombination on the accuracy of the
 263 likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. **Genetics**, v. 164, n. 3, p. 1229–
 264 1236, 2003.
- 265 AUGUSTINE, J. L.; RENSHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic
 266 purulent exudate on common barnyard fomites. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n.
 267 4, p. 713–715, 1986.
- 268 BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine
 269 Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, nov. 2007.
- 270 BARAKAT, A. *et al.* Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different
 271 animal species. **Rev Sci Tech Off Int Epiz**, v. 3, n. 1, p. 151–163, 1984.
- 272 BARAÚNA, R. A. *et al.* Assessing the Genotypic Differences between Strains of *Corynebacterium*
 273 pseudotuberculosis biovar equi through Comparative Genomics. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p.
 274 e0170676, 26 jan. 2017.
- 275 BARBA, M. *et al.* Experimental Transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar equi in
 276 Horses by House Flies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 636–643, mar. 2015.
- 277 BAYER, A. S. *et al.* Impact of the high-affinity proline permease gene (*putP*) on the virulence of
 278 *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 740–4,
 279 fev. 1999.
- 280 BERNARD, A. L.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. In: **Bergey's Manual of Systematic of Archaea**
 281 **and Bacteria**. [s.l.: s.n.]. p. 1–70.
- 282 BESPROZVANNAYA, M.; BURTON, B. M. Do the same traffic rules apply? Directional
 283 chromosome segregation by SpoIIIE and FtsK. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 599–608, ago.
 284 2014.
- 285 BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium*
 286 pseudotuberculosis. **The Veterinary Record**, v. 89, n. 26, p. 691–692, 1971.
- 287 BRAVERMAN, Y. *et al.* The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium*
 288 pseudotuberculosis in dairy herds in Israel. **Revue Scientifique et Technique (International Office**
 289 **of Epizootics)**, v. 18, n. 3, p. 681–90, dez. 1999.

- 290 BRETTIN, T. *et al.* RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for
291 building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, p.
292 8365, fev. 2015.
- 293 BRUEN, T. C.; PHILIPPE, H. H.; BRYANT, D. A simple and robust statistical test for detecting the
294 presence of recombination. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2665–81, abr. 2006.
- 295 CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; SILLA-MARTÍNEZ, J. M.; GABALDÓN, T. trimAl: A tool for
296 automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p.
297 1972–1973, 2009.
- 298 CARNE, H. R.; WICKHAM, N.; KATER, J. C. A Toxic Lipid from the Surface of *Corynebacterium*
299 *ovis*. **Nature**, v. 178, n. 4535, p. 701–702, set. 1956.
- 300 CASILLAS, S.; BARBADILLA, A. Molecular population genetics. **Genetics**, v. 205, n. 3, p. 1003–
301 1035, 2017.
- 302 CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M. *et al.* The complete genome sequence and analysis of
303 *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 22, p. 6516–23, nov.
304 2003.
- 305 CHAN, C. X.; RAGAN, M. A. Next-generation phylogenomics. p. 1–6, 2013.
- 306 CHEN, F. *et al.* Assessing Performance of Orthology Detection Strategies Applied to Eukaryotic
307 Genomes. **PLoS ONE**, v. 2, n. 4, p. e383, abr. 2007.
- 308 CHOUDHURI, S. Phylogenetic Analysis. In: **Bioinformatics for Beginners**. [s.l.] Elsevier, 2014. p.
309 209–218.
- 310 COHAN, F. M. Transmission in the Origins of Bacterial Diversity, From Ecotypes to Phyla.
311 **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 5, p. 1–26, 2017.
- 312 COLLETT, M.; BATH, G.; CAMERON, C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In:
313 **Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. [s.l.] Oxford University
314 Press, 1994. p. 1387–1395.
- 315 CROZAT, E.; GRAINGE, I. FtsK DNA Translocase: The Fast Motor That Knows Where It's Going.
316 **ChemBioChem**, v. 11, n. 16, p. 2232–2243, nov. 2010.
- 317 D'AFONSECA, V. *et al.* A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in
318 diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 252–260, 2008.
- 319 DORELLA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* : microbiology, biochemical properties,
320 pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, mar.
321 2006.
- 322 EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.
323 **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- 324 FOLEY, J. E. *et al.* Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated
325 from horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 12, p. 1734–1737, 2004.
- 326 GHONEIM, M. A. *et al.* Role of *Hippobosca equina* as a transmitter of *C. pseudotuberculosis* among
327 buffaloes as revealed by PCR and dot blot hybridization. **Journal of Egyptian Veterinary Medicine**
328 **Association**, v. 61, p. 165–176, 2001.
- 329 GOLDMAN, N.; YANG, Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA
330 sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 725–36, set. 1994.
- 331 GOMIDE, A. C. P. *et al.* Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium*
332 *pseudotuberculosis* biovar *Equi*. **Gene**, v. 645, n. December 2017, p. 124–130, 2018.

- 333 GUEDES, M. T. *et al.* Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: Aspectos
334 microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701–708,
335 2015.
- 336 HAGGERTY, L. S. *et al.* **A pluralistic account of homology: Adapting the models to the**
337 **data***Molecular Biology and Evolution*, 2014.
- 338 HALL, J. P. J.; BROCKHURST, M. A.; HARRISON, E. Sampling the mobile gene pool: innovation
339 via horizontal gene transfer in bacteria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London.**
340 **Series B, Biological sciences**, v. 372, n. 1735, p. 20160424, 2017.
- 341 HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal
342 macrophages. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 6, p. 1439–1449, 1975.
- 343 HASSAN, S. S. *et al.* Proteome scale comparative modeling for conserved drug and vaccine targets
344 identification in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 7, 2014.
- 345 HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in camels
346 (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 3,
347 p. 68–72, 2008a.
- 348 HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection (Caseous Lymphadenitis) in Camels
349 (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 3,
350 p. 68–72, mar. 2008b.
- 351 HEGGELUND, L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pneumonia in a Veterinary Student
352 Infected During Laboratory Work. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. ofv053-ofv053,
353 maio 2015.
- 354 HILL, C. Virulence or Niche Factors: What's in a Name? **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 21, p.
355 5725–5727, 1 nov. 2012.
- 356 HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. **The**
357 **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. s1, p. S156--S167, 2000.
- 358 HOLMQUIST, M. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms.
359 **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 2, p. 209–235, 2000.
- 360 HONGO, J. A. *et al.* POTION: an end-to-end pipeline for positive Darwinian selection detection in
361 genome-scale data through phylogenetic comparison of protein-coding genes. **BMC genomics**, v. 16,
362 n. 1, p. 567, 2015.
- 363 HUSSEIN, K. H. An unusual case of a huge abscess in a buffalo bull (*Bubalus bubalis*). **Buffalo**
364 **Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 183–185, 2012.
- 365 IKEDA, M.; NAKAGAWA, S. **The *Corynebacterium glutamicum* genome: Features and impacts**
366 **on biotechnological processes***Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003.
- 367 JACK, D. L.; YANG, N. M.; H. SAIER, M. The drug/metabolite transporter superfamily. **European**
368 **Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 13, p. 3620–3639, jul. 2001.
- 369 JUTTUKONDA, L. J.; SKAAR, E. P. Manganese homeostasis and utilization in pathogenic bacteria.
370 **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 216–228, jul. 2015.
- 371 KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene
372 sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of**
373 **Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1934–1936, abr. 2005.
- 374 KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v. 217, n. 5129, p. 624–6, fev. 1968.
- 375 KOONIN, E. V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics 1. **Annual review of genetics**, v.

- 376 39, n. 1, p. 309–338, dez. 2005.
- 377 KOPAC, S. *et al.* Genomic Heterogeneity and Ecological Speciation within One Subspecies of
378 *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 4842–4853, ago. 2014.
- 379 LAND, M. *et al.* Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & Integrative**
380 **Genomics**, v. 15, n. 2, p. 141–161, 2015.
- 381 LASSALLE, F.; MULLER, D.; NESME, X. Ecological speciation in bacteria: reverse ecology
382 approaches reveal the adaptive part of bacterial cladogenesis. **Research in microbiology**, v. 166, n.
383 10, p. 729–41, dez. 2015.
- 384 LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic
385 genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 9, p. 2178–89, set. 2003.
- 386 LOMAN, N. J.; PALLEN, M. J. **Twenty years of bacterial genome sequencing** **Nature Reviews**
387 **Microbiology** Nature Publishing Group, , 9 dez. 2015. Disponível em:
388 <<http://www.nature.com/articles/nrmicro3565>>
- 389 LOPES BASTOS, B. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal
390 Models and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 01, n. S4, 2012.
- 391 MANAT, G. *et al.* Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall
392 Unit Carrier at the Membrane Frontier. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 3, p. 199–214, jun.
393 2014.
- 394 MANDLIK, A. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human
395 pharyngeal epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 111–124, mar. 2007.
- 396 MANDLIK, A. *et al.* Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and
397 biofilm development. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 1, p. 33–40, 2008.
- 398 MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence
399 factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis* is regulated by multiple environmental factors and
400 plays a role in macrophage death. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2203–2211, 2007.
- 401 MEDINI, D. *et al.* The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15,
402 n. 6, p. 589–594, dez. 2005.
- 403 MISTOU, M.-Y.; GRIPON, J.-C. Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase PepC, a bacterial
404 bleomycin hydrolase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular**
405 **Enzymology**, v. 1383, n. 1, p. 63–70, mar. 1998.
- 406 MOSES, S. *et al.* Proline Utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and Catabolism. **Journal of**
407 **Bacteriology**, v. 194, n. 4, p. 745–758, fev. 2012.
- 408 MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of
409 *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375–381, ago. 2004.
- 410 MOUSSA, I. M. *et al.* Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling
411 caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.
412 23, n. 6, p. 718–723, nov. 2016.
- 413 NIELSEN, R.; YANG, Z. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and
414 applications to the HIV-1 envelope gene. **Genetics**, v. 148, n. 3, p. 929–936, 1998.
- 415 OMASITS, U. *et al.* Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental
416 proteomic data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 6, p. 884–886, 2014.
- 417 PATEL, S. Infection , Genetics and Evolution Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they
418 play in pathogen virulence , persistence and drug resistance. **MEEGID**, v. 45, p. 151–164, 2016.

- 419 PEARSON, W. R. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. In: **Current**
420 **Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. v. 1p. 1286–1292.
- 421 PEEL, M. M. *et al.* Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten
422 cases from Australia and review. **Clinical infectious diseases : an official publication of the**
423 **Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 2, p. 185–91, fev. 1997.
- 424 PETERSEN, L. *et al.* Genes under positive selection in *Escherichia coli*. **Genome Research**, v. 17, n.
425 9, p. 1336–1343, jul. 2007.
- 426 PINTO, A. C. *et al.* The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified
427 using ab initio methodologies. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 4, n. 7, p. 789–794, 2012.
- 428 PINTO, A. C. *et al.* Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in
429 response to abiotic stresses. **BMC genomics**, v. 15, p. 14, 2014.
- 430 RETIEF, J. D. Phylogenetic analysis using PHYLIP. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 243–
431 258, 2000.
- 432 ROBERT, F.; BRAKIER-GINGRAS, L. A Functional Interaction between Ribosomal Proteins S7 and
433 S11 within the Bacterial Ribosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44913–44920,
434 2003.
- 435 ROGERS, E. A.; DAS, A.; TON-THAT, H. Adhesion by Pathogenic *Corynebacteria*. In: [s.l: s.n.]. p.
436 91–103.
- 437 RUIZ, J. C. *et al.* Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence
438 functions in two *corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- 439 SCHNEIDER, A. *et al.* Estimates of Positive Darwinian Selection Are Inflated by Errors in
440 Sequencing, Annotation, and Alignment. **Genome Biology and Evolution**, v. 1, n. 0, p. 114–118,
441 2009.
- 442 SELIM, S. A. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine, Series**
443 **B**, v. 48, n. 4, p. 241–258, 2001.
- 444 SELIM, S. A. *et al.* Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from
445 *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 0–5, 2015.
- 446 SHEPPARD, S. K.; GUTTMAN, D. S.; FITZGERALD, J. R. Population genomics of bacterial host
447 adaptation. **Nature Reviews Genetics**, p. 1, 2018.
- 448 SILVA, W. M. *et al.* Label-free proteomic analysis to confirm the predicted proteome of
449 *Corynebacterium pseudotuberculosis* under nitrosative stress mediated by nitric oxide. **BMC**
450 **Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2014.
- 451 SILVA, W. M. *et al.* A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar
452 *ovis* after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. **BMC**
453 **Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017a.
- 454 SILVA, W. M. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis Reveals Changes in the Benchmark
455 *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *Equi* Exoproteome after Passage in a Murine Host.
456 **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, 2017b.
- 457 SING, A. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* in a free-roaming red fox: case report and historical
458 review on diphtheria in animals. **Infection**, 2015.
- 459 SOARES, S. C. *et al.* Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* strain
460 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. **Journal of**
461 **Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 135–141, 2013a.

- 462 SOARES, S. C. *et al.* The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis*
463 Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar *ovis* and *equi* Strains. **PLoS ONE**, v. 8,
464 n. 1, 2013b.
- 465 SOARES, S. C. *et al.* GIPSy: Genomic island prediction software. **Journal of Biotechnology**, v. 232,
466 p. 2–11, 2016.
- 467 SPIER, S. J.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: Increasing
468 frequency and spread to new regions of North America. **Equine Veterinary Education**, maio 2016.
- 469 STOREY, J. D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of**
470 **the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9440–5, ago.
471 2003.
- 472 STUDER, R. A.; ROBINSON-RECHAVI, M. Large-Scale Analyses of Positive Selection Using
473 Codon Models. In: **Evolutionary Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p.
474 217–235.
- 475 TAKAHASHI, T. *et al.* Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial
476 isolates based on the 16S rDNA sequence. **Microbiology and immunology**, v. 41, n. 9, p. 649–655,
477 1997.
- 478 TAUCH, A. *et al.* Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen
479 *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. **Journal of**
480 **bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4671–82, jul. 2005.
- 481 TAUCH, A.; BURKOVSKI, A. Molecular armory or niche factors: Virulence determinants of
482 *corynebacterium* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 23, p. 1–6, 2015.
- 483 TEJEDOR-JUNCO, M. T. *et al.* Isolation of nitrate-reductase positive *Corynebacterium*
484 *pseudotuberculosis* from dromedary camels. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, n. 3, p.
485 165–167, 2 abr. 2008.
- 486 TETTELIN, H. *et al.* Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current Opinion in**
487 **Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 472–477, out. 2008.
- 488 TOFT, C.; ANDERSSON, S. G. E. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host
489 adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 7, p. 465–475, 2 jul. 2010.
- 490 TROST, E. *et al.* The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41
491 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory
492 networks contributing to virulence. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 728, 2010.
- 493 VÄSTERMARK, Å. *et al.* Functional specialization in nucleotide sugar transporters occurred through
494 differentiation of the gene cluster *EamA* (DUF6) before the radiation of Viridiplantae. **BMC**
495 **Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 123, 2011.
- 496 VIANA, M. V. C. *et al.* Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis*
497 strains isolated from buffalo. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0176347, abr. 2017.
- 498 VOS, M. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. **Trends in microbiology**, v.
499 19, n. 1, p. 1–7, jan. 2011.
- 500 WANG, Q. *et al.* Identification of new antibacterial targets in RNA polymerase of *Mycobacterium*
501 *tuberculosis* by detecting positive selection sites. **Computational Biology and Chemistry**, 2017.
- 502 WANG, Y. *et al.* Bacterial Cell Growth Inhibitors Targeting Undecaprenyl Diphosphate Synthase and
503 Undecaprenyl Diphosphate Phosphatase. **ChemMedChem**, v. 11, n. 20, p. 2311–2319, 2016.
- 504 WATTAM, A. R. *et al.* Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and
505 Analysis Resource Center. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D535–D542, jan. 2017.

- 506 WEBB, S. A.; KAHLER, C. M. Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host
507 defences. **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 234, 2008.
- 508 WENNERHOLD, J.; KRUG, A.; BOTT, M. The AraC-type Regulator RipA Represses Aconitase and
509 Other Iron Proteins from *Corynebacterium* under Iron Limitation and Is Itself Repressed by DtxR.
510 **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40500–40508, dez. 2005.
- 511 WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. A tight link between orthologs and bidirectional best hits in bacterial
512 and archaeal genomes. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1286–1294, 2012.
- 513 WONG, W. S. W. Accuracy and Power of Statistical Methods for Detecting Adaptive Evolution in
514 Protein Coding Sequences and for Identifying Positively Selected Sites. **Genetics**, v. 168, n. 2, p.
515 1041–1051, out. 2004.
- 516 XU, Z.; CHEN, H.; ZHOU, R. Genome-wide evidence for positive selection and recombination in
517 *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 203, 2011.
- 518 YANAGAWA, R.; HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and
519 pathogens of the genus *Corynebacterium*. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 4, p. 1293–1295, 1976.
- 520 YANG, Z. *et al.* Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites.
521 **Genetics**, v. 155, n. 1, p. 431–49, maio 2000.
- 522 YANG, Z. Bayes Empirical Bayes Inference of Amino Acid Sites Under Positive Selection.
523 **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 1107–1118, jan. 2005.
- 524 YANG, Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. **Molecular Biology and**
525 **Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1586–1591, abr. 2007.
- 526 YANG, Z.; DOS REIS, M. Statistical properties of the branch-site test of positive selection.
527 **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 3, p. 1217–1228, 2011.
- 528 YANG, Z.; NIELSEN, R. Codon-Substitution Models for Detecting Molecular Adaptation at
529 Individual Sites Along Specific Lineages. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 6, p. 908–917,
530 jun. 2002.
- 531 YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. **Nature Reviews**
532 **Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303–314, 2012.
- 533 YERUHAM, I. *et al.* Mastitis in Dairy Cattle Caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the
534 Feasibility Of Transmission by Houseflies I. **Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 87–89, set. 1996.
- 535 YERUHAM, I. *et al.* A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a
536 dairy cattle herd. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 5, p. 315–320, 2004.
- 537 ZHANG, J. Evaluation of an Improved Branch-Site Likelihood Method for Detecting Positive
538 Selection at the Molecular Level. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 12, p. 2472–2479, ago.
539 2005.
- 540

VI. Conclusão e Perspectivas

A introdução desta dissertação apresentou uma revisão sobre a biologia e a genômica estrutural de *C. pseudotuberculosis*, além da análise de seleção positiva como uma ferramenta para estudo da biologia bacteriana. A análise de seleção positiva em escala genômica com 29 genomas de *C. pseudotuberculosis* detectou genes provavelmente envolvidos na colonização dos hospedeiros, como adesão, captação de nutrientes e modulação do sistema imune do hospedeiro. Contribuiu também para o entendimento da evolução dos biovares, por meio da interpretação da árvore filogenômica da espécie e dados da literatura.

Como perspectivas futuras, pretende-se:

- a. realizar uma análise de seleção positiva em escala genômica utilizando genomas de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* para identificar pressões seletivas envolvidas em suas especiações e preferências por hospedeiros;
- b. predizer a existência de diferentes ecótipos usando o programa Ecotype Simulator;
- c. analisar o polimorfismo das regiões promotoras e relacionar com a provável diferenciação da expressão gênica;
- d. investigar a interação dos genes identificados em redes regulatórias;
- e. selecionar possíveis alvos para desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

VII. Referências

- ALIKHAN, N.-F. *et al.* BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, dez. 2011.
- ALMEIDA, S. *et al.* Exploration of Nitrate Reductase Metabolic Pathway in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **International Journal of Genomics**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- ALTENHOFF, A. M.; DESSIMOZ, C. Phylogenetic and functional assessment of orthologs inference projects and methods. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 1, 2009.
- ANISIMOVA, M.; BIELAWSKI, J. P.; YANG, Z. Accuracy and Power of Bayes Prediction of Amino Acid Sites Under Positive Selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 6, p. 950–958, 2002.
- ANISIMOVA, M.; NIELSEN, R.; YANG, Z. Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. **Genetics**, v. 164, n. 3, p. 1229–1236, 2003.
- AUGUSTINE, J. L.; RENSHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 4, p. 713–715, 1986.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, nov. 2007.
- BARAKAT, A. . *et al.* Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different animal species. **Rev Sci Tech Off Int Epiz**, v. 3, n. 1, p. 151–163, 1984.
- BARAÚNA, R. A. *et al.* Assessing the Genotypic Differences between Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi through Comparative Genomics. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170676, 26 jan. 2017.
- BARBA, M. *et al.* Experimental Transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar equi in Horses by House Flies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 636–643, mar. 2015.
- BAYER, A. S. *et al.* Impact of the high-affinity proline permease gene (putP) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 740–4, fev. 1999.
- BERNARD, A. L.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. In: **Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–70.
- BESPROZVANNAYA, M.; BURTON, B. M. Do the same traffic rules apply? Directional

chromosome segregation by SpoIIIE and FtsK. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 599–608, ago. 2014.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **The Veterinary Record**, v. 89, n. 26, p. 691–692, 1971.

BRAVERMAN, Y. *et al.* The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 18, n. 3, p. 681–90, dez. 1999.

BRETTIN, T. *et al.* RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8365, fev. 2015.

BRUEN, T. C.; PHILIPPE, H. H.; BRYANT, D. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2665–81, abr. 2006.

CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; SILLA-MARTÍNEZ, J. M.; GABALDÓN, T. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1972–1973, 2009.

CARNE, H. R.; WICKHAM, N.; KATER, J. C. A Toxic Lipid from the Surface of *Corynebacterium ovis*. **Nature**, v. 178, n. 4535, p. 701–702, set. 1956.

CASILLAS, S.; BARBADILLA, A. Molecular population genetics. **Genetics**, v. 205, n. 3, p. 1003–1035, 2017.

CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M. *et al.* The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 22, p. 6516–23, nov. 2003.

CHAN, C. X.; RAGAN, M. A. Next-generation phylogenomics. p. 1–6, 2013.

CHEN, F. *et al.* Assessing Performance of Orthology Detection Strategies Applied to Eukaryotic Genomes. **PLoS ONE**, v. 2, n. 4, p. e383, abr. 2007.

CHOUDHURI, S. Phylogenetic Analysis. In: **Bioinformatics for Beginners**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 209–218.

COHAN, F. M. Transmission in the Origins of Bacterial Diversity, From Ecotypes to Phyla. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 5, p. 1–26, 2017.

COLLETT, M.; BATH, G.; CAMERON, C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: **Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. [s.l.] Oxford

University Press, 1994. p. 1387–1395.

CROZAT, E.; GRAINGE, I. FtsK DNA Translocase: The Fast Motor That Knows Where It's Going. **ChemBioChem**, v. 11, n. 16, p. 2232–2243, nov. 2010.

D'AFONSECA, V. *et al.* A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 252–260, 2008.

DORELLA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, mar. 2006.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FOLEY, J. E. *et al.* Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 12, p. 1734–1737, 2004.

GHONEIM, M. A. *et al.* Role of *Hippobosca equina* as a transmitter of *C. pseudotuberculosis* among buffaloes as revealed by PCR and dot blot hybridization. **Journal of Egyptian Veterinary Medicine Association**, v. 61, p. 165–176, 2001.

GOLDMAN, N.; YANG, Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 725–36, set. 1994.

GOMIDE, A. C. P. *et al.* Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi. **Gene**, v. 645, n. December 2017, p. 124–130, 2018.

GUEDES, M. T. *et al.* Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: Aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701–708, 2015.

HAGGERTY, L. S. *et al.* **A pluralistic account of homology: Adapting the models to the data** **Molecular Biology and Evolution**, 2014.

HALL, J. P. J.; BROCKHURST, M. A.; HARRISON, E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 372, n. 1735, p. 20160424, 2017.

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 6, p. 1439–1449, 1975.

- HASSAN, S. S. *et al.* Proteome scale comparative modeling for conserved drug and vaccine targets identification in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 7, 2014.
- HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 3, p. 68–72, 2008a.
- HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection (Caseous Lymphadenitis) in Camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 3, p. 68–72, mar. 2008b.
- HEGGELUND, L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pneumonia in a Veterinary Student Infected During Laboratory Work. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. ofv053-ofv053, maio 2015.
- HILL, C. Virulence or Niche Factors: What's in a Name? **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 21, p. 5725–5727, 1 nov. 2012.
- HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. s1, p. S156–S167, 2000.
- HOLMQUIST, M. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 2, p. 209–235, 2000.
- HONGO, J. A. *et al.* POTION: an end-to-end pipeline for positive Darwinian selection detection in genome-scale data through phylogenetic comparison of protein-coding genes. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 567, 2015.
- HUSSEIN, K. H. An unusual case of a huge abscess in a buffalo bull (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 183–185, 2012.
- IKEDA, M.; NAKAGAWA, S. **The *Corynebacterium glutamicum* genome: Features and impacts on biotechnological processes** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003.
- JACK, D. L.; YANG, N. M.; H. SAIER, M. The drug/metabolite transporter superfamily. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 13, p. 3620–3639, jul. 2001.
- JUTTUKONDA, L. J.; SKAAR, E. P. Manganese homeostasis and utilization in pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 216–228, jul. 2015.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1934–1936, abr. 2005.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v. 217, n. 5129, p. 624–6, fev. 1968.

KOONIN, E. V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics 1. **Annual review of genetics**, v. 39, n. 1, p. 309–338, dez. 2005.

KOPAC, S. *et al.* Genomic Heterogeneity and Ecological Speciation within One Subspecies of *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 4842–4853, ago. 2014.

LAND, M. *et al.* Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & Integrative Genomics**, v. 15, n. 2, p. 141–161, 2015.

LASSALLE, F.; MULLER, D.; NESME, X. Ecological speciation in bacteria: reverse ecology approaches reveal the adaptive part of bacterial cladogenesis. **Research in microbiology**, v. 166, n. 10, p. 729–41, dez. 2015.

LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 9, p. 2178–89, set. 2003.

LOMAN, N. J.; PALLEN, M. J. **Twenty years of bacterial genome sequencing** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 9 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro3565>>

LOPES BASTOS, B. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 01, n. S4, 2012.

MANAT, G. *et al.* Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 3, p. 199–214, jun. 2014.

MANDLIK, A. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 111–124, mar. 2007.

MANDLIK, A. *et al.* Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 1, p. 33–40, 2008.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis* is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2203–2211, 2007.

- MEDINI, D. *et al.* The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 6, p. 589–594, dez. 2005.
- MISTOU, M.-Y.; GRIPON, J.-C. Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase PepC, a bacterial bleomycin hydrolase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1383, n. 1, p. 63–70, mar. 1998.
- MOSES, S. *et al.* Proline Utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and Catabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 4, p. 745–758, fev. 2012.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375–381, ago. 2004.
- MOUSSA, I. M. *et al.* Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 718–723, nov. 2016.
- NIELSEN, R.; YANG, Z. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. **Genetics**, v. 148, n. 3, p. 929–936, 1998.
- OMASITS, U. *et al.* Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 6, p. 884–886, 2014.
- PATEL, S. Infection, Genetics and Evolution Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. **MEEGID**, v. 45, p. 151–164, 2016.
- PEARSON, W. R. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. v. 1p. 1286–1292.
- PEEL, M. M. *et al.* Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 2, p. 185–91, fev. 1997.
- PETERSEN, L. *et al.* Genes under positive selection in *Escherichia coli*. **Genome Research**, v. 17, n. 9, p. 1336–1343, jul. 2007.
- PINTO, A. C. *et al.* The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified using ab initio methodologies. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 4, n. 7, p. 789–794, 2012.
- PINTO, A. C. *et al.* Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

in response to abiotic stresses. **BMC genomics**, v. 15, p. 14, 2014.

RETIEF, J. D. Phylogenetic analysis using PHYLIP. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 243–258, 2000.

ROBERT, F.; BRAKIER-GINGRAS, L. A Functional Interaction between Ribosomal Proteins S7 and S11 within the Bacterial Ribosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44913–44920, 2003.

ROGERS, E. A.; DAS, A.; TON-THAT, H. Adhesion by Pathogenic Corynebacteria. In: [s.l.: s.n.]. p. 91–103.

RUIZ, J. C. *et al.* Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two corynebacterium pseudotuberculosis strains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

SCHNEIDER, A. *et al.* Estimates of Positive Darwinian Selection Are Inflated by Errors in Sequencing, Annotation, and Alignment. **Genome Biology and Evolution**, v. 1, n. 0, p. 114–118, 2009.

SELIM, S. A. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 48, n. 4, p. 241–258, 2001.

SELIM, S. A. *et al.* Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from Corynebacterium pseudotuberculosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 0–5, 2015.

SHEPPARD, S. K.; GUTTMAN, D. S.; FITZGERALD, J. R. Population genomics of bacterial host adaptation. **Nature Reviews Genetics**, p. 1, 2018.

SILVA, W. M. *et al.* Label-free proteomic analysis to confirm the predicted proteome of Corynebacterium pseudotuberculosis under nitrosative stress mediated by nitric oxide. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2014.

SILVA, W. M. *et al.* A shift in the virulence potential of Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017a.

SILVA, W. M. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis Reveals Changes in the Benchmark Corynebacterium pseudotuberculosis Biovar Equi Exoproteome after Passage in a Murine Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, 2017b.

SING, A. *et al.* Corynebacterium diphtheriae in a free-roaming red fox: case report and historical review on diphtheria in animals. **Infection**, 2015.

SOARES, S. C. *et al.* Genome sequence of Corynebacterium pseudotuberculosis biovar equi

strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 135–141, 2013a.

SOARES, S. C. *et al.* The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar *ovis* and *equi* Strains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013b.

SOARES, S. C. *et al.* GIPSy: Genomic island prediction software. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 2–11, 2016.

SPIER, S. J.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: Increasing frequency and spread to new regions of North America. **Equine Veterinary Education**, maio 2016.

STOREY, J. D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9440–5, ago. 2003.

STUDER, R. A.; ROBINSON-RECHAVI, M. Large-Scale Analyses of Positive Selection Using Codon Models. In: **Evolutionary Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 217–235.

TAKAHASHI, T. *et al.* Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial isolates based on the 16S rDNA sequence. **Microbiology and immunology**, v. 41, n. 9, p. 649–655, 1997.

TAUCH, A. *et al.* Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4671–82, jul. 2005.

TAUCH, A.; BURKOVSKI, A. Molecular armory or niche factors: Virulence determinants of corynebacterium species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 23, p. 1–6, 2015.

TEJEDOR-JUNCO, M. T. *et al.* Isolation of nitrate-reductase positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* from dromedary camels. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, n. 3, p. 165–167, 2 abr. 2008.

TETTELIN, H. *et al.* Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 472–477, out. 2008.

TOFT, C.; ANDERSSON, S. G. E. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 7, p. 465–475, 2 jul. 2010.

TROST, E. *et al.* 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. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 728, 2010.

VÄSTERMARK, Å. *et al.* Functional specialization in nucleotide sugar transporters occurred through differentiation of the gene cluster EamA (DUF6) before the radiation of Viridiplantae. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 123, 2011.

VIANA, M. V. C. *et al.* Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0176347, abr. 2017.

VOS, M. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–7, jan. 2011.

WANG, Q. *et al.* Identification of new antibacterial targets in RNA polymerase of *Mycobacterium tuberculosis* by detecting positive selection sites. **Computational Biology and Chemistry**, 2017.

WANG, Y. *et al.* Bacterial Cell Growth Inhibitors Targeting Undecaprenyl Diphosphate Synthase and Undecaprenyl Diphosphate Phosphatase. **ChemMedChem**, v. 11, n. 20, p. 2311–2319, 2016.

WATTAM, A. R. *et al.* Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D535–D542, jan. 2017.

WEBB, S. A.; KAHLER, C. M. Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 234, 2008.

WENNERHOLD, J.; KRUG, A.; BOTT, M. The AraC-type Regulator RipA Represses Aconitase and Other Iron Proteins from *Corynebacterium* under Iron Limitation and Is Itself Repressed by DtxR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40500–40508, dez. 2005.

WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. A tight link between orthologs and bidirectional best hits in bacterial and archaeal genomes. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1286–1294, 2012.

WONG, W. S. W. Accuracy and Power of Statistical Methods for Detecting Adaptive Evolution in Protein Coding Sequences and for Identifying Positively Selected Sites. **Genetics**, v. 168, n. 2, p. 1041–1051, out. 2004.

- XU, Z.; CHEN, H.; ZHOU, R. Genome-wide evidence for positive selection and recombination in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 203, 2011.
- YANAGAWA, R.; HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 4, p. 1293–1295, 1976.
- YANG, Z. *et al.* Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. **Genetics**, v. 155, n. 1, p. 431–49, maio 2000.
- YANG, Z. Bayes Empirical Bayes Inference of Amino Acid Sites Under Positive Selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 1107–1118, jan. 2005.
- YANG, Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1586–1591, abr. 2007.
- YANG, Z.; DOS REIS, M. Statistical properties of the branch-site test of positive selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 3, p. 1217–1228, 2011.
- YANG, Z.; NIELSEN, R. Codon-Substitution Models for Detecting Molecular Adaptation at Individual Sites Along Specific Lineages. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 6, p. 908–917, jun. 2002.
- YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303–314, 2012.
- YERUHAM, I. *et al.* Mastitis in Dairy Cattle Caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the Feasibility Of Transmission by Houseflies I. **Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 87–89, set. 1996.
- YERUHAM, I. *et al.* A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 5, p. 315–320, 2004.
- ZHANG, J. Evaluation of an Improved Branch-Site Likelihood Method for Detecting Positive Selection at the Molecular Level. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 12, p. 2472–2479, ago. 2005.

VIII. Anexo

Congressos, cursos nacionais e internacionais, apresentação de pôsters

Verifique o código de autenticidade 14013.075001.00257.3 em www3.com.br/bifdocuments



-meeting 2016

Belo Horizonte | November 16th to 18th



12th International Conference of the AB3C

Certificate of poster presentation

This certifies that the work entitled **R script to HLA epitope predictor based in matrix frequency: training and performance comparisons**, authored by **Alessandra Lima da Silva** and **Leandro Martins de Freitas** was presented during the poster session of the X-Meeting 2016 - 12th International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C), held in Belo Horizonte - Brazil between November 16 and 18 of 2016.

Nicole Scherer

Nicole Scherer
Poster Session Chair

Mainá Bitar

Mainá Bitar
Poster Session Co-Chair

Gloria Franco

Gloria Franco
AB3C President



AB3C

Verifique o código de autenticação 135194875061.6.8 em <http://www.evsn3.com.br/bicourverao>

II CURSO DE VERÃO EM BIOINFORMÁTICA



Certificamos que **Alessandra Lima da Silva**, participou da Comissão Organizadora do II Curso de Verão em Bioinformática realizado pelo Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 22/01/2018 a 26/01/2018, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Belo Horizonte, 26 de janeiro de 2018.

Thiago Mafra Batista
Comissão Organizadora

Glória Regina Franco
Coordenadora PPG Bioinfo/UFMG

Patrocínio



Apoio



Realização



 **69ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC**

18 A 22 DE JULHO DE 2017 | UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS | BELO HORIZONTE - MG - BRASIL

CERTIFICADO

Certificamos que **ALESSANDRA LIMA** participou como expositor da SBPC Jovem durante a 69ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), ocorrida entre os dias 17 e 22 de julho de 2017, no campus da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Oficina: DESVENDANDO OS MISTÉRIOS DO DNA


Carga horária: 1 hora

Emissão: Agosto de 2017.

Certificado nº ADEBRA0119 - Este número permite a verificação da autenticidade deste documento no site da SBPC: <http://portal.sbpcnet.org.br/certificados/>



Helena B. Nader
Presidente da SBPC
Coordenadora da 69ª Reunião Anual




Claudia Masini d'Avila Covy
Secretária-Geral da SBPC
Coordenadora da 69ª Reunião Anual

I CURSO DE VERÃO EM BIOINFORMÁTICA



Certificamos que **Alessandra Lima da Silva** participou da Comissão Organizadora do I Curso de Verão em Bioinformática, realizado no período de 13 a 17 de fevereiro de 2017, pelo Programa Interunidades de Pós Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.



Vasco Azevedo de C. Azevedo
Coordenador do PPG Bioinfo/UFMG

Apoio:



Realização:





Certificado

Certificamos que **ALESSANDRA LIMA DA SILVA**, concluiu o curso Produção Oral: interações acadêmicas - , nível A2, com carga horária de 32 horas, Número do Registro 452194, com nota 10.00, oferecido pelo Núcleo de Línguas da UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS no âmbito do Programa Idiomas sem Fronteiras - Inglês no período de 30/10/2017 a 29/12/2017.



Utilize um leitor de QR Code no código acima para validar este certificado ou use o código validador 454B2CE6 em <http://isfahmo.mec.gov.br/validar-certificado>

Denise Martins de Abreu e Lima
Presidente do Programa IsF



Ministério da
Educação



RUPTURA 2017 UFMG

RUPTURA

QUAL É A SUA RUPTURA?

CERTIFICADO

Alessandra Lima da Silva

participou do evento Ruptura UFMG 2017, na Escola de Engenharia da UFMG, com duração total de 45 horas entre os dias 31/07/2017 e 04/08/2017.

JOANA BRETZ DE SOUZA
IDEALIZADORA DO RUPTURA E SÓCIA DA OPTIMUS

PROF. ALESSANDRO FERNANDES MOREIRA
DIRETOR DA ESCOLA DE ENGENHARIA DA UFMG

REALIZAÇÃO



I Curso de Inverno de Bioinformática



Certificado de participação

Certificamos que
Alessandra Lima da Silva
 participou do *I Curso de Inverno do Programa de
 Pós-graduação em Bioinformática*
 da Universidade Federal de Minas Gerais,
 assistindo, em sua totalidade às aulas teórico-práticas,
 totalizando 34 horas.

O curso foi realizado no período de 11 a 15
 de julho de 2016, no Campus Pampulha da UFMG,
 em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Renick P. Olivo

Membro da comissão organizadora

Vasco Ariston de C. Azevedo

Coordenador do PPGBioinfo/UFMG

Apoio:

Waters
 THE SCIENCE OF
 WHAT'S POSSIBLE™

illumina

Agilent

Realização:



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL
 DE MINAS GERAIS





69ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC

16 A 22 DE JULHO DE 2017 | UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS | BELO HORIZONTE - MG - BRASIL

CERTIFICADO


Certificamos que **ALESSANDRA LIMA** participou da 69ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada de 16 a 22 de julho de 2017, na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Emissão: Julho de 2017.

Certificado nº AP69RA9119 - Este número permite a verificação da autenticidade deste documento no site da SBPC:
<http://portal.sbpcnet.org.br/certificados/>



Helena B. Nador
Presidente da SBPC
Coordenadora da 69ª Reunião Anual



Claudia Masini d'Avila Levy
Secretária-Geral da SBPC
Coordenadora da 69ª Reunião Anual

Verifique o código de autenticação 14914.875061.6.8 em event3.com.br/documentos



X-meeting 2016

Belo Horizonte | November 16th to 18th



12th International Conference of the AB3C

Certificate of Participation

This certifies that **Alessandra Lima da Silva** has participated in the X-Meeting 2016 - 12th International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C), held in Belo Horizonte - Brazil between November 16 and 18 of 2016.

Belo Horizonte, 18th November 2016

Glória Franco

Glória Franco
AB3C President

Alan Durham
AB3C Vice-President



AB³C

Verifique o código de autenticação 14919.875061.88656.8 em event3.com.br/documentos



X-meeting 2016

Belo Horizonte | November 16th to 18th



12th International Conference of the AB3C

This certifies that **Alessandra Lima da Silva** has attended the 6 hours Study group entitled "RSG Brazil - 1st Student Council Symposium" during the X-Meeting 2016 - 12th International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C), held in Belo Horizonte - Brazil between November 16 and 18 of 2016.

Glória Franco

Glória Franco
AB3C President

Alan Durham
AB3C Vice-President



AB³C

GENÉTICA 2016

Brazilian-International Congress of Genetics
11 a 14 de setembro de 2016 - Hotel Glória, Caxambu, MG



ALESSANDRA LIMA DA SILVA
47088

participou do 62º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA realizado em Caxambu, MG, período de 11 a 14 de setembro de 2016, com carga horária equivalente a 31H de atividades.


Fabiano Rodrigues dos Santos
Presidente do SBC


SBC


Célia Maria de Almeida Soares
Diretora Científica do SBC