

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DIVERSIDADE, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE
NUCLEASES EXTRACELULARES DE *Aeromonas* spp.**

JUCIMAR ZACARIA

CAXIAS DO SUL
2016

JUCIMAR ZACARIA

**DIVERSIDADE, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE
NUCLEASES EXTRACELULARES DE *Aeromonas spp.***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Caxias do Sul
2016

Z13d Zacaria, Jucimar
Diversidade, clonagem e caracterização de nucleases extracelulares de
Aeromonas spp. / Jucimar Zacaria. – 2016.
258 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2016.
Orientação: Sergio Echeverrigaray.
Coorientação: Ana Paula Longaray Delamare.

1. Aeromas. 2. DNases extracelulares. 3. Termoestabilidade. 4. Dns. 5.
Aha3441. I. Echeverrigaray, Sergio, orient. II. Delamare, Ana Paula
Longaray, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

JUCIMAR ZACARIA

**DIVERSIDADE, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE
NUCLEASES EXTRACELULARES DE *Aeromonas* spp.**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando à obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.*

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

TESE APROVADA EM 11 DE ABRIL DE 2016

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Profa. Dra. Andrea Balan

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

“Duvide sempre de si mesmo, até que os dados
não deixem lugar a dúvidas.”

Louis Pasteur

Dedico este trabalho a todos aqueles que me incentivaram a sempre buscar algo mais e a nunca desistir dos sonhos, por mais distantes que pareçam, em especial ao meu pai, a minha mãe, a minha irmã, a minha avó Gema e a minha namorada Carol.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador professor Dr. Sergio Echeverrigaray, pelo incentivo e pelo exemplo de competência e perseverança. Por acreditar na minha capacidade de pesquisador, por me ensinar a ver aquilo que ninguém viu, e, sobretudo pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todos veem.

A professora Dra. Ana Paula Longaray Delamare pelo seu apoio, incentivo, sugestões e amizade durante todo o tempo de convívio no laboratório.

A professora Dra. Mirian Salvador pela amizade, exemplo de pesquisadora e pelo acompanhamento crítico ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Jomar Laurino Pereira pela análise minuciosa deste trabalho, por sua ética, amizade e solidariedade, que sempre lhe foi peculiar.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia, pela colaboração, incentivo, convivência e amizade em especial ao meu amigo Maurício Schiavo.

A todos os colegas do programa de Pós-graduação em Biotecnologia, em especial ao meu amigo Edegar.

A todos os meus colegas e acima de tudo amigos do Laboratório Analitus, pela compreensão, apoio e incentivo.

Aos professores e funcionários do INBI pelos conhecimentos transmitidos e pelos exemplos de ética e caráter, que carregarei para a minha vida.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro que foi primordial na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do qual me orgulho enormemente de fazer parte!

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
ANEXOS	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVO GERAL	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 O gênero <i>Aeromonas</i> , características e classificação taxonômica	4
3.2 Distribuição de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	8
3.3 Aspectos clínicos associados ao gênero <i>Aeromonas</i>	12
3.4 Fatores de patogenicidade associados ao gênero <i>Aeromonas</i>	16
3.5 Nucleases	22
3.5.1 Nucleases microbianas	25
3.5.2 Nucleases de <i>Aeromonas</i> spp.	29
3.6 Predição de estruturas proteicas empregando ferramentas de bioinformática	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Linhagens bacterianas utilizadas	35
4.2 Condições de cultivo	36
4.3 Obtenção dos extratos brutos de proteínas extracelulares	36
4.4 Obtenção de extratos de proteínas periplasmáticas	36
4.5 Avaliação quantitativa da atividade DNásica extracelular	37
4.6 Avaliação quantitativa da atividade DNásica extracelular termooestável	38
4.7 Avaliação semiquantitativa da atividade DNásica	38
4.8 Avaliação dos perfis de nucleases extracelulares e cálculo da atividade DNásica com base na área de degradação	39
4.9 Avaliação da estabilidade térmica de DNases extracelulares empregando zimogramas	40
4.10 Curva de crescimento e determinação da atividade DNásica extracelular quantitativa de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	40
4.11 Avaliação do efeito de proteases sobre a atividade DNásica extracelular de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	41

4.12 Curva de crescimento e determinação da atividade DNásica extracelular quantitativa empregando DNA como fonte de nitrogênio e fósforo em <i>A. hydrophila</i> IBAer119	41
4.13 Amplificação e clonagem dos códons dos genes <i>dns</i> e <i>aha3441</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	43
4.13.1 Amplificação dos códons dos genes <i>dns</i> e <i>aha3441</i>	43
4.13.2 Separação eletroforética e visualização dos fragmentos amplificados	44
4.13.3 Ligação e clonagem dos genes <i>dns</i> e <i>aha3441</i>	44
4.13.4 Obtenção de células competentes e transformação	45
4.13.5 Sequenciamento dos genes <i>dns</i> e <i>aha3441</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	46
4.14 Avaliação do efeito de inibidores sobre a atividade das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	47
4.15 Determinação da temperatura de ação das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	48
4.16 Determinação do pH de ação das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	48
4.17 Avaliação do efeito de diferentes cofatores na atividade das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	49
4.18 Determinação da estabilidade térmica das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	49
4.19 Avaliação da atividade enzimática sobre DNA e RNA, do extrato contendo as enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	50
4.20 Avaliação do efeito de DNA como fonte de nitrogênio e fósforo na expressão dos genes <i>dns</i> , <i>aha3441</i> e <i>nuc</i> em <i>A. hydrophila</i> IBAer119 através de <i>real time</i> PCR (RTq-PCR)	50
4.20.1 Extração de RNA total	50
4.20.2 Construção dos <i>primers</i> para avaliação da expressão por <i>real time</i> PCR (qRT-PCR) dos genes <i>dns</i> , <i>aha3441</i> , <i>nuc</i> e <i>16S rRNA</i>	51
4.20.3 Transcrição reversa para obtenção de cDNA	52
4.20.4 Amplificação por <i>real time</i> PCR (RTq-PCR)	53
4.20.5 Análise dos resultados obtidos via <i>real time</i> PCR (RT-qPCR)	53
4.21 Análise in silico de bioinformática	53
4.22 Análises estatísticas	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

5.1 Atividade DNásica extracelular semi-quantitativa de <i>Aeromonas</i> spp	55
5.2 Quantificação da atividade DNásica extracelular de <i>Aeromonas</i> spp.	59
5.3 Avaliação da variabilidade nos repertórios de DNases extracelulares de <i>Aeromonas</i> spp.....	62
5.4 Estabilidade térmica de DNases extracelular empregando zimogramas	75
5.5 Curva de crescimento e quantificação da atividade DNásica extracelular de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	80
5.6 Efeito de DNA como fonte de nitrogênio e fósforo no crescimento e atividade DNásica extracelular de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	89
5.7 Clonagem, expressão heteróloga, caracterização e modelagem proteica das DNases extracelulares Dns e Aha de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	101
5.7.1 Clonagem e expressão do gene <i>dns</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	102
5.7.2 Caracterização da atividade enzimática da DNase recombinante Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	107
5.7.3 Análise de bioinformática in silico da DNase Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	118
5.7.4 Clonagem e expressão do gene <i>Aha3441</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	136
5.7.5 Caracterização enzimática da DNase Aha3441 recombinante de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	141
5.7.6 Análise de Bioinformática in silico da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119	150
5.8 Atividade das DNases extracelulares recombinantes Dns e Aha3441 sobre RNA e DNA plasmidial linearizado	180
6. CONCLUSÕES	182
7. PERSPECTIVAS	186
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	187
9. ANEXOS.....	217

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de espécies descritas como pertencentes ao gênero <i>Aeromonas</i>	5
Tabela 2. Distribuição relativa de espécies de <i>Aeromonas</i> no ambiente.....	11
Tabela 3. Nucleases e sua numeração de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.....	24
Tabela 4. Descrição das linhagens de <i>Aeromonas</i> spp.: denominação, espécie e origem.	35
Tabela 5. <i>Primers</i> , sequências, tamanho do fragmento amplificado e aplicação.....	43
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para análise de sequenciamento dos genes <i>dns</i> e <i>aha3441</i>	47
Tabela 7. Sequências de <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes empregados na análise de <i>Real Time PCR</i>	52
Tabela 8. Atividade DNásica em placas de <i>DNase Test Agar</i> após 24 h.....	56
Tabela 9. Atividade DNásica relativa em placas de <i>DNase Test Agar</i> após 48 h.....	57
Tabela 10. Quantificação da atividade DNásica de extratos extracelulares sobre DNA de esperma de salmão para 48 isolados de <i>Aeromonas</i> spp.	60
Tabela 11. Quantificação da atividade DNásica de extratos extracelulares após aquecimento, sobre DNA de esperma de salmão para 48 isolados de <i>Aeromonas</i> spp.....	61
Tabela 12. Somatório das áreas correspondentes as bandas de degradação em géis de poliacrilamida co-polimerizados com DNA se esperma de salmão.	67
Tabela 13. Atividade DNásica ajustadas com base na D.O. de crescimento em diferentes meios de cultivo.....	91
Tabela 14. Atividade DNásica dos parentais e transformante em placas de <i>DNase Test Agar</i>	105
Tabela 15. Comparação entre a composição nucleotídica (GC), cobertura e identidade da ORF do gene <i>dns</i> de <i>Aeromonas</i>	122
Tabela 16. Sequências de peptídeo sinal, posição de clivagem, <i>D score</i> e proteína Dns madura de <i>Aeromonas</i> . ↓ indica o ponto de clivagem.....	125
Tabela 17. Comparação da proteína Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 com relação a seus homólogos em <i>Aeromonas</i>	126
Tabela 18. Atividade DNásica dos parentais e transformante em placas de <i>DNase Test Agar</i>	139

Tabela 19. Comparação entre a composição nucleotídica (GC) cobertura e identidade do gene correspondente a <i>aha3441</i> de <i>Aeromonas</i>	156
Tabela 20. Sequências de peptídeo sinal, posição de clivagem, D <i>score</i> e proteína Aha3441 madura de <i>Aeromonas</i> . ↓ indica o ponto de clivagem.	160
Tabela 21. Comparação da proteína Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 com relação a seus homólogos em <i>Aeromonas</i>	161
Tabela 22. Análise comparativa entre a DNase Aha 3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 e a DNase Nuc de diferentes espécies de <i>Aeromonas</i>	168
Tabela 23. Relação dos modelos cristalográficos empregados na modelagem da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	172

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atividade DNásica semi-quantitativa em placas de DNase Test Agar acrescido de 0,01% de Azul de Toluidina. A- IBAer016; B- IBAer017; C- IBAer101; D- IBAer102; E- IBAer103; F- IBAer105; G- IBAer106; H- IBAer117 e I- IBAer119..... 55
- Figura 2.** Perfis de DNases extracelulares obtidos em géis de poliacrilamida utilizando DNA de esperma de salmão como substrato para isolados representativos de *Aeromonas* spp. 1- IBAer001, 2- IBAer002, 3- IBAer005, 4- IBAer009, 5- IBAer010, 6- IBAer103, 7- IBAer158, 8- IBAer119 e 9- IBAer144. 62
- Figura 3.** Análise de agrupamento (UPGMA) baseado no perfil de atividade DNásica de *Aeromonas* spp.. Esquema das bandas e suas massas moleculares estimadas. Bandas de coloração diferente indicam diferenças nas intensidades das atividades. **A. veronii* var. *sobria*. 65
- Figura 4.** Média da área correspondente a cada banda e sua frequência de distribuição entre os isolados avaliados. 68
- Figura 5.** Relação entre a atividade quantitativa (espectrofotométrica - U/mL/min) e pelo somatório das áreas (pixel) das bandas (zimogramas). Linhas tracejadas e normais paralelas a regressão indicam intervalo de confiança de 95 e 99%, respectivamente. 72
- Figura 6.** Relação entre a atividade quantitativa (espectrofotométrica - U/mL/min) e atividade semi-quantitativa (placas de *DNase Test Agar*). Linhas tracejadas e normais paralelas à regressão indicam intervalo de confiança de 95 e 99%, respectivamente. 73
- Figura 7.** Relação entre a atividade semi-quantitativa (placas de *DNase Test Agar*) e o somatório das áreas (pixel) das bandas (zimogramas). Linhas tracejadas e normais paralelas a regressão indicam intervalo de confiança de 95 e 99%, respectivamente. 74
- Figura 8.** Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer010 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer010 (B). 75
- Figura 9.** Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer012 (A). Gráfico representando o

percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer012 (B).....	76
Figura 10. Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer112 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer112 (B).....	77
Figura 11. Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C em extratos extracelulares de IBAer119 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C em extratos extracelulares de IBAer119 (B).....	78
Figura 12. Curva de crescimento e atividade DNásica extracelular em <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	81
Figura 13. Curva de crescimento em relação à atividade extracelular (área-zimograma). (A) DNase de 103 KDa (nuc); (B) DNase de 85 KDa (aha); (C) DNase de 32 KDa (desconhecida) e (D) DNase de 22 KDa (dns).	82
Figura 14. Zimograma representando a atividade DNásica extracelular (A), e periplasmática (B), em IBAer119, após 20 h de crescimento.	84
Figura 15. Atividade DNásica total em função do tempo de crescimento (A). Expressão dos genes <i>nuc</i> (B), <i>aha</i> (C) e <i>dns</i> (D), em função do tempo de crescimento. Curva de crescimento de IBAer119 (E).	86
Figura 16. Relação da atividade DNásica extracelular com a atividade proteásica extracelular em IBAer119.	87
Figura 17. Atividade DNásica do extrato extracelular obtido com 20 h em relação a misturas em diferentes proporções do extrato extracelular obtido com 48 h de cultivo em IBAer119.	88
Figura 18. Relação entre o crescimento e a atividade DNásica extracelular em meio M9 (A), M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (B), M9 menos fonte de fósforo (C), M9 menos fósforo acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (D), M9 menos fonte de nitrogênio (E), e M9 menos nitrogênio acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (F).....	90
Figura 19. Atividade DNásica extracelular em função do tempo em meio M9 (A), e meio M9 acrescido de DNA (B), Expressão do gene <i>nuc</i> em meio M9 (C), e em meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA (D). Expressão do gene <i>aha</i> em meio M9 (E), e em meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA (F), Expressão do gene <i>dns</i>	

em meio M9 (G), e em meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA (H), Crescimento em função do tempo em meio M9 (I), e em meio M9 acrescido 10 µg/mL de DNA (J).....	93
Figura 20. Atividade DNásica extracelular em função do tempo em meio M9 sem fósforo (A), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (B), Expressão do gene <i>nuc</i> em meio M9 sem fósforo (C), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (D). Expressão do gene <i>aha</i> em meio M9 sem fósforo (E), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (F), Expressão do gene <i>dns</i> em meio M9 sem fósforo (G), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (H), Crescimento em função do tempo em meio M9 sem fósforo (I), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (J).	96
Figura 21. Atividade DNásica extracelular em função do tempo em meio M9 sem nitrogênio (A), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (B), Expressão do gene <i>nuc</i> em meio M9 sem nitrogênio (C), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (D). Expressão do gene <i>aha</i> em meio M9 sem nitrogênio (E), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (F), Expressão do gene <i>dns</i> em meio M9 sem nitrogênio (G), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (H), Crescimento em função do tempo em meio M9 sem nitrogênio (I), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (J).....	98
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose (1,5%), correspondente à amplificação do gene <i>dns</i> empregado na ligação. Marcador de peso molecular 100 pb DNA <i>Ladder</i> (1), gene <i>dns</i> de IBAer119 (2, 3, 4), controle negativo (5).	102
Figura 23. Mapa representando a construção do vetor contendo o gene <i>dns</i>	103
Figura 24. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) para a confirmação da clonagem do gene <i>dns</i> em IBAer119-dnsC5. Marcador de peso molecular 100 pb DNA <i>Ladder</i> (1), fragmento correspondente a região codificadora do gene <i>dns</i> do transformante IBAer119-dnsC5 (2), DH5α (3), fragmento correspondente a região codificadora do gene <i>dns</i> de IBAer119 (controle positivo) (4), e controle negativo (5).	104
Figura 25. Curva de crescimento (A) e atividade DNásica extracelular (B) das linhagens <i>A. hydrophila</i> IBAer119, <i>E. coli</i> DH5α e o transformante IBAer119-dnsC5 em meio LB.	106
Figura 26. Relação da atividade enzimática da DNase recombinante Dns em função dos	

diferentes cofatores empregados. 10mM Tris-HCl pH8 (A), acrescido de: 5mM MgCl ₂ (B), 5mM CaCl ₂ (C), 5mM BaCl ₂ (D), 5mM MnCl ₂ (E), 5mM ZnSO ₄ (F), 5mM CuSO ₄ (G), 5mM FeSO ₄ (H), e 5mM MgCl ₂ + 2mM CaCl ₂ (I).....	108
Figura 27. Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns. Controle sem adição de inibidores (A), EDTA 10mM (B), Citrato de sódio 10mM (C), Fosfato de sódio 10mM (D), DTT 10mM (E), β-Mercaptoetanol 10mM (F) e SDS 1% (G).	110
Figura 28. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	113
Figura 29. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	115
Figura 30. Efeito do pré-tratamento térmico sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	116
Figura 31. Sequência nucleotídica correspondente à ORF da DNase Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 clonada em <i>E. coli</i> DH5α. Nucleotídeos adenina (verde), timina (vermelho), citosina (azul) e guanidina (preto).	119
Figura 32. Análise de agrupamento (<i>Neighbor-Joining</i>), baseado na sequência nucleotídica de DNases Dns em representantes do gênero <i>Aeromonas</i> . Círculo preto (●), indica a posição <i>A. hydrophila</i> IBAer119, isolado empregado neste trabalho.	120
Figura 33. Sequência de aminoácidos (aa), deduzida a partir da ORF do gene <i>dns</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	124
Figura 34. Análise de alinhamento e predição da estrutura secundária da DNase Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação aos seus homólogos. Letras em coloração vermelha indicam α-hélices, letras em coloração azul indicam β-folhas. Números na parte superior das sequências indicam o nível de conservação de cada aminoácido. Os resíduos conservados de cisteína estão grifados em coloração amarela. Quadrantes indicam domínios conservados correspondentes a super família endonuclease I (EC: 3.1.21.1).	128
Figura 35. Alinhamento de sequências predita de aminoácidos da Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação a representantes dos gêneros <i>Escherichia</i> , <i>Oceanimonas</i> , <i>Aliivibrio</i> , <i>Dickeya</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shewanella</i> e <i>Vibrio</i> . Peptídeos sinais localizados na região N-terminal estão representados em amarelo. Resíduos conservados de cisteína estão marcados em verde e resíduos responsáveis pela	

ligação a metais estão marcados em vermelho.....	131
Figura 36. Modelo estrutural tridimensional da proteína Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 (A), baseado na endonuclease IuouA de <i>V. vulnificus</i> (B). Círculos tracejados indicam diferenças entre o modelo de Dns e IuouA.....	132
Figura 37. Modelo estrutural tridimensional da proteína Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 representando as quatro ligações dissulfeto.....	133
Figura 38. Visão geral (A) e detalhada (B) do cluster correspondente ao sítio de ligação a metais da proteína Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.....	134
Figura 39. Representação do sítio ativo da DNase Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 (A). Alinhamento correspondente a região do sítio ativo em diferentes espécies de bactérias (B). Letras amarelas e vermelhas representam os resíduos correspondentes ao sítio ativo da enzima. Letras marcadas na coloração vermelha indicam resíduos responsáveis pela ligação a metal. Quadrantes tracejados correspondem a His59, resíduo importante para a hidrólise de DNA.	135
Figura 40. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) à amplificação do fragmento contendo a ORF do gene <i>aha3441</i> empregado na ligação. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (1), fragmento contendo a ORF do gene <i>aha3441</i> de IBAer119 (2,3,4), controle negativo (5).	137
Figura 41. Mapa representando a construção do vetor contendo o gene <i>aha3441</i>	138
Figura 42. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) para a confirmação da clonagem do gene <i>aha3441</i> em IBAer119-ahaC8. DH5 α (1), gene <i>aha3441</i> amplificado com os <i>primers</i> <i>aha3441</i> -1F e <i>aha3441</i> -1R no transformante IBAer119-ahaC8 (2 e 3), controle positivo amplificado com os <i>primers</i> <i>aha3441</i> -1F, <i>aha3441</i> -1R no isolado IBAer119 (4), Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (5), gene <i>aha3441</i> amplificado com os <i>primers</i> <i>aha3441</i> -2F e <i>aha3441</i> -2R no transformante IBAer119-ahaC8 (6 e 7), controle positivo amplificado com os <i>primers</i> <i>aha3441</i> -2F, <i>aha3441</i> -2R no isolado IBAer119 (8), controle negativo (9).....	138
Figura 43. Curva de crescimento (A) e atividade DNásica extracelular (B) das linhagens <i>A. hydrophila</i> IBAer119, <i>E. coli</i> DH5 α e o transformante IBAer119-ahaC8 em meio LB.	140
Figura 44. Relação da atividade DNásica da enzima recombinante Aha3441 em função dos diferentes cofatores empregados. 10 mM Tris-HCl pH8 (A), acrescido de: 5 mM MgCl ₂ (B), 5 mM CaCl ₂ (C), 5 mM BaCl ₂ (D), 5 mM MnCl ₂ (E), 5 mM ZnSO ₄ (F), 5 mM CuSO ₄ (G), 5 mM FeSO ₄ (H), e 5 mM MgCl ₂ + 2 mM CaCl ₂ (I).	

.....	142
Figura 45. Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Aha3441. Controle sem adição de inibidores (A), EDTA 10 mM (B), Citrato de sódio 10 mM (C), Fosfato de sódio 10 mM (D), DTT 10 mM (E), β -mercaptoetanol 10mM (F) e SDS 1% (G).	144
Figura 46. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da DNase Aha3441 recombinante de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	146
Figura 47. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática ótima da DNase recombinante Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	147
Figura 48. Efeito do pré-tratamento térmico sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	149
Figura 49. Sequência nucleotídicas correspondente a ORF da DNase <i>aha3441</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119. Nucleotídeos adenina (verde), timina (vermelho), citosina (azul) e guanidina (preto).	152
Figura 50. Análise de agrupamento (<i>Neighbor-Joining</i>) baseado na sequência nucleotídica de DNases Aha3441 em representantes do gênero <i>Aeromonas</i> . Círculo preto (●) indica a posição de <i>A. hydrophila</i> IBAer119, isolado empregado neste trabalho.	153
Figura 51. Sequência de aminoácidos (aa), deduzida a partir da ORF do gene <i>aha3441</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	160
Figura 52. Análise de alinhamento e predição da estrutura secundária da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação aos seus homólogos. Letras em coloração vermelha indicam α -hélices, letras em coloração azul indicam β -folhas. Quadrantes contínuos indicam domínios conservador correspondentes a nuclease MnuA (EEP) de <i>Mycoplasma pulmonis</i> . Quadrantes tracejados indicam domínios conservador correspondentes a YhcR-OBf-Like. Números na parte superior das sequências indicam o nível de conservação de cada aminoácido. Os resíduos conservados de cisteína estão grifados em coloração amarela.	166
Figura 53. Representação esquemática dos domínios conservados das DNases Aha3441 (A) e Nuc (B), mostrando os domínios comuns a ambas as enzimas.	169
Figura 54. Modelo estrutural tridimensional da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119. (A) Domínio YhcR-OBf-like e (B) Domínio EEP (<i>Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase</i>).	173
Figura 55. Gráfico de Ramachandran baseado no modelo tridimensional da DNase	

Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer 119.....	174
Figura 56. Modelagem tridimensional do domínio YhcR-OBF-like (A), e gráfico de Ramachandran correspondente a modelagem do domínio YhcR-OBF-like da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer 119 (B).	175
Figura 57. Modelagem tridimensional do domínio EEP (<i>Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase</i>) (A), e gráfico de Ramachandran correspondente a modelagem do domínio EEP (<i>Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase</i>) da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer 119 (B).	176
Figura 58. Modelo tridimensional do domínio EEP correspondente a DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 (A). Modelo tridimensional da cadeia D da DNase pancreática bovina BP DNase I (B). Região central representada por pontos coloridos correspondem aos sítios catalíticos.....	178
Figura 59. Representação dos sítios de ligação a metais (A) e sítios de ligação a fosfato (B), observados no domínio EEP da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	179
Figura 60. Representação do sítio catalítico da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119.	180
Figura 61. Digestão de RNA e DNA plasmidial por Dns e Aha3441. 1- RNA e DNA plasmidial não tratado enzimaticamente, 2- RNA e DNA plasmidial tratado com a enzima Dns, 3- RNA e DNA plasmidial tratado com a enzima Aha3441, 4- Controle positivo, RNA e DNA plasmidial tratado com RNase A (RNA) ou DNase I (DNA plasmidial).....	181

ANEXOS

Anexo I. Análise de alinhamento da sequência nucleotídicas correspondente ao gene <i>dns</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação aos seus homólogos.	217
Anexo II. Tabela exibindo a comparação da proteína Dns de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação a seus homólogos em outras espécies bacterianas.	221
Anexo III. Análise de alinhamento da sequência nucleotídicas correspondente ao gene <i>aha3441</i> de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação aos seus homólogos em <i>Aeromonas</i>	223
Anexo IV. Tabela exibindo a comparação da proteína Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação a seus homólogos em outras espécies bacterianas.	231
Anexo V. Alinhamento de sequências da DNase Aha3441 de <i>A. hydrophila</i> IBAer119 em relação a representantes dos gêneros <i>Aliivibrio</i> , <i>Enterovibrio</i> , <i>Grimontia</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Shewanella</i> e <i>Vibrio</i>	232

RESUMO

Aeromonas spp. são bactérias Gram-negativas relacionadas, principalmente, a ecossistemas aquáticos. Estas bactérias são consideradas patógenos oportunistas de diversos animais, inclusive o homem. Algumas espécies gênero *Aeromonas* secretam uma ampla variedade de enzimas extracelulares, dentre elas β -lactamases, lipases, amilases, proteases, e nucleases entre outras. As nucleases podem desempenhar múltiplos papéis relacionados ao metabolismo, à proteção contra a entrada de material genético exógeno e, em alguns casos, como fator de virulência. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças nas atividades de DNases extracelulares e o perfil eletroforético entre espécies e isolados do gênero *Aeromonas*; a clonagem e expressão heteróloga, caracterização frente a fatores físicos/químicos que afetam a atividade enzimática e análise de bioinformática das DNases Dns e Aha3441, bem como a avaliação da expressão dos genes *nuc*, *dns* e *aha3441* de *Aeromonas hydrophila* IBAer119. Os resultados mostraram uma ampla variação intra e interespecífica na atividade de DNases extracelulares, sem diferença significativa entre isolados clínicos e ambientais. Zimogramas dos isolados de *Aeromonas* spp., empregando DNA como substrato, possibilitaram a identificação de diferentes perfis de atividade DNásica. Um total de seis bandas de massa molecular aparente variando entre 22 e 119 KDa foram identificadas. As bandas de 22 e 85 KDa foram as mais frequentes entre os isolados de *Aeromonas* spp. analisados. As DNases secretadas por *A. hydrophila* IBAer119 são afetadas pela ação de proteases produzidas pelo próprio isolado. A avaliação da expressão dos genes *dns*, *aha3441* e *nuc* de *A. hydrophila* IBAer119 permitiu observar maiores taxas transcricionais para os genes *dns* e *aha3441*, as quais, coincidem com o pico de atividade DNásica extracelular. As DNases extracelulares identificadas no isolado de *A. hydrophila* IBAer119 não desempenham preferencialmente, um papel nutricional, sugerindo que sua função pode estar relacionada à proteção contra entrada de DNA exógeno ou à virulência. As enzimas Dns e Aha3441 provenientes de *A. hydrophila* IBAer119 foram clonadas e expressas de forma heteróloga em *Escherichia coli* DH5 α . Ambas DNases utilizam Mg como co-fator e são inibidas por EDTA e SDS. A avaliação permitiu observar que Dns e Aha3441 apresentam pHs de ação entre 7,0 e 9,0 e temperaturas de atividade entre 37°C e 60°C, para Dns, e temperaturas de atividade entre 37°C e 50°C, para Aha3441. Ambas DNases apresentam elevada estabilidade térmica quando mantidas a 40°C por até 50 minutos. Tanto Dns quanto Aha3441 apresentaram capacidade de degradar RNA e DNA sendo assim caracterizadas como nucleases açúcar não específicas. A análise da sequência proteica permitiu identificar a presença de um peptídeo sinal de 20aa para a enzima Dns e 23aa para a enzima Aha3441, indicando que estas enzimas são secretadas por sistema secII. Além disso, a avaliação de bioinformática permitiu identificar que Dns apresenta um domínio correspondente à superfamília da Endonuclease I e apresenta elevado grau de similaridade com DNases de outros gêneros bacterianos. Já a DNase Aha3441 apresenta domínios correspondentes à superfamília EEP e a subfamília OB folds, similares aos observados em outra DNase de *Aeromonas* spp. denominada Nuc. O modelo tridimensional de Dns permitiu observar a presença de um sítio catalítico com topologia $\beta\beta\alpha$ -metal, típico de outras endonucleases. Já o modelo tridimensional de Aha3441 permitiu observar uma elevada similaridade conformacional com a cadeia D da DNase pancreática bovina (BP DNase I). Além disso, os sítios de ligação a metais, sítios de ligação a fosfato e sítio catalítico apresentam elevado grau de conservação quando comparados com homólogos encontrados em outras bactérias e mesmo em relação à BP DNase I, indicando que Aha3441 compartilha o mesmo mecanismo de ação.

Palavras-chave: *Aeromonas*, DNases extracelulares, termoestabilidade, Dns, Aha3441.

ABSTRACT

Aeromonas spp. are Gram-negative bacteria generally associated to aquatic ecosystems. These bacterial are considered opportunistic pathogens of various animals, including man. Some species of this genus can secrete a wide variety of extracellular enzymes, such as, β -lactamases, lipases, amylases, proteases, nucleases, among others. Nucleases can play multiple roles related to metabolism, protection against exogenous genetic material and, in some cases, virulence factor. In this context, the aim of this study was to evaluate the differences in extracellular DNases activities and electrophoretic profiles between species and isolates of *Aeromonas* spp., cloning and heterologous expression of nucleases, effect of physical/chemical factors on the enzyme activity, evaluation of *nuc*, *dns* and *aha3441* expression, and bioinformatics analysis of DNases Dns and Aha3441. The results showed a wide variation in intra- and interspecific DNases extracellular activity, without significant difference between clinical and environmental isolates. DNase zymograms of *Aeromonas* spp. isolates, using DNA as a substrate, allowed the identification of different DNase activity profiles. A total of six bands of apparent molecular mass ranging between 22 and 119 KDa were identified. Bands of 22 and 85 KDa were the most frequent among *Aeromonas* spp. isolates analyzed. The DNases secreted by *Aeromonas hydrophila* IBAer119 are affected by the action of proteases produced by the isolate itself. The evaluation of *dns*, *aha3441* and *nuc* gene expression of *A. hydrophila* IBAer119 allowed observing high transcription rates for *dns* and *aha3441* genes, which coincide with the peak of extracellular DNase activity. Extracellular DNases identified in isolated *A. hydrophila* IBAer119 do not play preferably a nutritional role, indicating that its function can be related to protection against exogenous DNA or virulence. The enzymes Dns and Aha3441 from *A. hydrophila* IBAer119 were cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli* DH5 α . Both DNases uses Mg as a cofactor and are inhibited by EDTA and SDS. Experimental data indicates that Dns and Aha3441 have maximal activity at pHs between 7.0 and 9.0, and temperatures between 37°C and 60°C, for Dns, and between 37°C and 50°C, for Aha3441. Both enzymes exhibited high thermal stability when kept at 40°C for 50 minutes. Dns and Aha3441 showed ability to degrade RNA and DNA characterizing them as sugar non-specific nucleases. The sequence analysis of the protein identified the presence of a signal peptide with 20aa, for Dns enzyme, and 23aa, for Aha3441 enzyme, indicating that these enzymes are secreted by secII system. Moreover, the bioinformatics evaluation of the Dns allowed identifying an Endonuclease I superfamily domain, and with high similarity with DNases of the others bacterial genera. DNase Aha3441 has an EEP superfamily domain and OB subfamily folds, similar to those observed in another *Aeromonas* DNase called Nuc. The three-dimensional model of Dns indicates the presence a catalytic site with $\beta\beta\alpha$ -metal topology, typical of other endonucleases. The three-dimensional model of Aha3441 showed high conformational similarity with the D chain of the BP DNase I (bovine pancreatic DNase). In addition, the metal binding, the phosphate binding, and the catalytic sites of Aha3441 showed high degree of conservation when compared with homologs of other bacteria, and even BP DNase I, indicating that Aha3441 shares the same mechanism of action.

Keywords: *Aeromonas*, extracellular DNases, thermostability, Dns, Aha3441.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O título do trabalho que divulgou o primeiro genoma completo de uma bactéria do gênero *Aeromonas* realizado por Seshadri *et al.* no ano de 2006 vinha acompanhado da expressão “*Jack of All Trades*”, que, em uma tradução livre significa “pau para toda a obra”, uma referência ao poderoso arsenal adaptativo e metabólico destes microrganismos. De fato, as aeromonas são cosmopolitas, habitam águas doces e salobras, encontram-se em solos, vegetais e animais, inclusive o homem, atuando como saprófitos ou patógenos oportunistas, crescendo ou sobrevivendo amplas faixas de temperatura e pH. Entre as ferramentas adaptativas deste gênero bacteriano se sobressai um conjunto de enzimas periplasmáticas ou extracelulares caracterizadas como β lactamases, proteases, lipases, amilases, quitinases, e nucleases, entre outras.

Muitas destas enzimas podem desencadear um papel nutricional na aquisição de nutrientes relacionados, principalmente, a fontes de carbono, nitrogênio e fósforo. No entanto, a função das nucleases extracelulares parece não estar restrita a apenas isto. As nucleases extracelulares têm sido postuladas como enzimas que participam de processos invasivos em células de hospedeiros, podendo estar relacionadas à patogenicidade. Entretanto, a hipótese de que estas enzimas estejam envolvidas na gênese de doenças, não tem sido comprovada experimentalmente. O que é evidente, no entanto, é que isolados de *Aeromonas* spp. mantidos sob condições laboratoriais são capazes de produzir nucleases extracelulares, as quais atuam sobre ácidos nucleicos, degradando-os e impossibilitando manipulações ou aplicações futuras. Este fato foi constatado em experimentos realizados em nosso laboratório envolvendo produtos de PCR amplificados a partir de células lisadas cujo DNA foi utilizado como molde. Além disso, a presença de nucleases extracelulares reflete um desafio no isolamento de DNA plasmidial ou cromossômico intacto, imprimindo dificuldades relacionadas a

transformações ou eletroporações, levando a crer que estas enzimas desempenham uma barreira à entrada de material genético exógeno nestas bactérias.

Duas diferentes nucleases extracelulares (DNases) com massas moleculares de aproximadamente 25 e 114 KDa foram identificadas em *Aeromonas hydrophila*. Embora existam alguns estudos relacionados à caracterização bioquímica destas enzimas em particular, outros estudos complementares ainda são necessários, os quais podem contribuir para uma melhor elucidação do papel das nucleases extracelulares nestes organismos. Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar a diversidade de nucleases (DNases) extracelulares produzidas por um conjunto de espécies de *Aeromonas* proveniente de distintas coleções e isoladas a partir de amostras clínicas e ambientais. A partir de então, um isolado em particular de *A. hydrophila*, designado como IBAer119, foi utilizado para estudos envolvendo a expressão gênica das nucleases Dns, Aha3441 e Nuc em meio completo ou meio mínimo empregando DNA como fonte de fósforo e/ou nitrogênio. Este isolado também foi empregado em estudos relacionados à clonagem de dois genes correspondentes às nucleases Dns e Aha3441. A caracterização bioquímica referente à temperatura de ação, pH de ação, efeito de cofatores, e efeito de inibidores frente à atividade DNásica foi realizada para as duas enzimas (Dns e Aha3441) clonadas e expressas de forma heteróloga em *Escherichia coli* DH5α. Por fim, estudos de bioinformática empregando sequências nucleotídicas e peptídicas foram realizados, possibilitando a comparação entre nucleases de diferentes gêneros bacterianos, assim como, a predição das estruturas secundárias e tridimensionais para as enzimas Dns e Aha3441.

Estudos avaliando a diversidade de nucleases extracelulares em bactérias do gênero *Aeromonas*, bem como, estudos de bioinformática buscando caracterizar a estrutura tridimensional destas enzimas são escassos ou inexistentes. O estudo

envolvendo a caracterização destas nucleases podem auxiliar na elucidação das funções biológicas destas enzimas e suas relações evolutivas entre nucleases presentes em outros gêneros bacterianos. Além disso, este estudo pode contribuir para uma avaliação inicial do potencial biotecnológica destas enzimas, visto que, as nucleases são utilizadas na degradação de DNA fita dupla (DNase I), degradação de RNA (RNase A), redução do comprimento de moléculas de DNA (DNase S1), degradação de DNA fita simples, ou mesmo processos industriais nos quais se deseja retirar os ácidos nucléicos, como a produção de proteína microbiana, entre outros.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de nucleases extracelulares (DNases) em distintos isolados de *Aeromonas* spp. O presente trabalho também objetivou a avaliação da expressão gênica das nucleases Dns, Aha3441 e Nuc utilizando meio completo ou meio mínimo empregando DNA como fonte de fósforo e/ou nitrogênio, assim como, a clonagem, expressão heteróloga, caracterização bioquímica e estudo de bioinformática de duas nucleases extracelulares designadas como Dns e Aha3441, provenientes do isolado de *A. hydrophila* designado como IBAer119.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias do gênero *Aeromonas* tem recebido uma atenção especial em virtude de sua ampla capacidade de estabelecimento em uma variada escala de condições ambientais e, principalmente, pelo fato destes organismos estarem associados a doenças tanto em animais de sangue frio quanto animais de sangue quente, incluindo o homem. Além disso, nos últimos anos, surtos de doenças de origem alimentar têm sido atribuídos a algumas espécies deste gênero. Diante de tais evidências, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e *United State Environmental Protection Agency* (US EPA) têm considerado estas bactérias como patógenos emergentes (USEPA, 2005).

3.1 O gênero *Aeromonas*, características e classificação taxonômica

O gênero *Aeromonas* é constituído por bacilos Gram-negativos, não esporulantes, retos com extremidades arredondadas, ou células que se aproximam da forma esférica. As bactérias deste gênero são caracterizadas como catalase e oxidase positivas, anaeróbicas facultativas, quimiorganotróficas, redutoras de nitrato a nitrito, inositol negativas, fermentadoras de glicose e vários outros carboidratos, com formação de ácido e/ou gás e resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato) (Garrit *et al.*, 2001; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005). Este gênero pode ser dividido em dois grupos principais: grupo I denominado grupo *hydrophila* caracterizado por aeromonas mesofílicas, móveis, associadas a infecções em seres humanos e o grupo II denominado grupo *salmonicida*, caracterizado por aeromonas psicofílicas, não móveis, capazes de produzir pigmento marrom e patogênicas de peixes (Janda & Abbott, 2010).

De um modo geral, o gênero *Aeromonas* tem sido considerado um grupo de

taxonomia complexa. Nas últimas duas décadas, o gênero tem sofrido uma série de revisões taxonômicas e em sua nomenclatura. Durante algum tempo o gênero *Aeromonas* foi classificado como pertencente à família Vibrionaceae (Carnahan & Altwegg, 1996; Altwegg, 1999), mas atualmente encontra-se classificado em uma família própria denominada Aeromonadaceae inicialmente sugerida por Colwell & MacDonell (1986) e Martinez-Murcia *et al.* (1992) através da análise de sequências do 16S rRNA e 5S rRNA e confirmada no manual Berger's (Garrit *et al.*, 2001). Segundo a LPSN (*List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature*), o gênero *Aeromonas* abriga 35 espécies, sendo que algumas destas espécies se encontram em análise pelo ICSP (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*). A Tabela 1 representa de uma forma simplificada as espécies descritas de *Aeromonas*, significância, e formas de confirmação das espécies descritas.

Tabela 1. Lista de espécies descritas como pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Espécies (ano) ^a	Sig. clínica ^b	Distinção de espécies ^c		Outra denominação (ano) ^d
		Gen.	Bioquím.	
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1943) / 5 subespécies	+	+	+	
<i>Aeromonas salmonicida</i> (1953) / 5 subespécies	+ ^e	+	+	
<i>Aeromonas punctata</i> (1957) / 2 subespécies	+	+	+	<i>A. caviae</i>
<i>Aeromonas sobria</i> (1981)	–	+	–	
<i>Aeromonas media</i> (1983)	+	+	+	
<i>Aeromonas caviae</i> (1984)	+	+	+	<i>A. punctata</i> (1957)
<i>Aeromonas veronii</i> (1988) ^f	+	+	+	<i>A. ichthiosmia</i> (1991)
<i>Aeromonas eucrenophila</i> (1988)	–	+	–	
<i>Aeromonas schubertii</i> (1989)	+	+	+	HG13
<i>Aeromonas enteropelogenes</i> (1991)	–	+	+	<i>A. trota</i> (1993 /2002)
<i>Aeromonas ichthiosmia</i> (1991)	–	+	+	<i>A. veronii</i> (1993 /2001)
<i>Aeromonas jandaei</i> (1992)	+	+	+	
<i>Aeromonas trota</i> (1992)	+	+	+	<i>A. enteropelogenes</i> (1991)
<i>Aeromonas encheleia</i> (1995)	–	+	–	HG11
<i>Aeromonas bestiarum</i> (1996)	+	+	+	
<i>Aeromonas popoffii</i> (1997)	+	+	–	
<i>Aeromonas simiae</i> (2004)	–	+	–	
<i>Aeromonas molluscorum</i> (2004)	–	+	+	
<i>Aeromonas bivalvium</i> (2007)	–	+	+	
<i>Aeromonas aquariorum</i> (2008)	+	+	+	<i>A. dhakensis</i> (2013)
<i>Aeromonas tecta</i> (2008)	+	+	+	
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> (1992)	–	+	+	<i>A. veronii</i> (2007)
<i>Aeromonas culicicola</i> (2002)	–	+	+	<i>A. veronii</i>
<i>Aeromonas sharmana</i> (2006)	–	+	–	Indefinida

Continua

Espécies (ano) ^a	Sig. clínica ^b	Distinção de espécies ^c		Outra denominação (ano) ^d
		Gen.	Bioquím.	
<i>Aeromonas diversa</i> (2010)	—	+	+	
<i>Aeromonas fluvialis</i> (2010)	—	+	+	
<i>Aeromonas piscícola</i> (2010)	—	+	+	
<i>Aeromonas sanarellii</i> (2010)	+	+	+	
<i>Aeromonas taiwanensis</i> (2010)	+	+	+	
<i>Aeromonas rivuli</i> (2011)	—	+	+	
<i>Aeromonas australiensis</i> (2013)	—	+	+	
<i>Aeromonas dhakensis</i> (2013)	+	+	+	
<i>Aeromonas aquatica</i> (2015)	—	+	+	
<i>Aeromonas finlandensis</i> (2015)	—	+	+	
<i>Aeromonas lacus</i> (2015)	—	+	+	

^a Ano da proposta válida para o nome da espécie. ^b Isolado de material clínico em mais do que uma ocasião ou associada de forma inequívoca a infecções em humanos. ^c Genética significa separação com base em hibridização DNA-DNA ou genes específicos. Bioquímica significa que há um número de propriedades fenotípicas que podem separar $\geq 90\%$ das linhagens isoladas em laboratórios clínicos. ^d Outros nomes comumente utilizados na literatura para descrever a mesma espécie. ^e Presença de um subconjunto de linhagens dentro de *A. salmonicida* que crescem de forma satisfatória entre 35 e 37°C e podem ser isolados de pacientes clínicos. Estas linhagens são diferenciadas por serem indol negativas, não móveis, produtoras de melanina e associadas a doenças em peixes. ^f Sem subespécies, mas apresenta dois distintos biovars (*veronii* e *sobria*).

Apesar dos esforços desprendidos para a organização taxonômica e da nomenclatura das espécies do gênero *Aeromonas*, algumas controvérsias ainda permanecem. Um exemplo desta controvérsia é *A. culicicola*, a qual foi isolada e descrita como uma nova espécie por Pidiyar *et al.* (2002). No entanto, uma série de estudos envolvendo hibridização DNA-DNA, sequenciamento dos genes *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoD* e *dnaJ*, e avaliação de metil ésteres de ácidos graxos indicaram que *A. culicicola* e *A. veronii* são indistinguíveis, sugerindo que *A. culicicola* é apenas um sinônimo de *A. veronii* (Soler *et al.*, 2004; Huys *et al.*, 2005; küpfer *et al.*, 2006; Nhung *et al.* 2007; Saavedra *et al.*, 2007).

Outra espécie com classificação problemática é *A. sharmana*, descrita por Saha & Chakrabarti (2006), com base em apenas um isolado ambiental (GPTSA-6^T). Estudos posteriores realizados por Saavedra *et al.*, (2006) e Martínez-Murcia *et al.*, (2007), identificaram uma série de características moleculares e bioquímicas, as quais, apontam que *A. sharmana* não apresenta suporte para ser incluída no gênero *Aeromonas*. Os potenciais nomes para esta bactéria incluem *Manjusharmella aquatica* ou *Halofoba aquatica*, mas nenhum destes foi formalmente proposto ou validado (Martínez-Murcia

et al., 2007).

Apesar de ter sido originalmente proposta por Schubert e colaboradores em 1990, *A. ichthiosmia* permanece com sua classificação duvidosa. Estudos empregando o sequenciamento do gene *16S rRNA* e análises de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), demonstraram que esta espécie é idêntica a *A. veronii* biovar. *sobria* (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). Fenotipicamente, a linhagem referência de *A. ichthiosmia* é similar à linhagem referência de *A. veronii* biovar. *sobria*, indicando então que *A. ichthiosmia* pode ser considerado um sinônimo de *A. veronii*.

A espécie *A. enteropelogenes* também proposta por Schubert e colaboradores em 1991, foi avaliada empregando a relação DNA-DNA em comparação a linhagem referência de *A. trota*. Esta comparação permitiu confirmar observações prévias, indicando que as duas espécies são idênticas. Entretanto, uma decisão do ICSP (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*) é aguardada para determinar a correta nomenclatura.

Outra divergência na classificação é apontada para *A. punctata*. De acordo com registros, *A. punctata* e *A. caviae* compartilham o mesmo código (ATCC15468^T). Este problema surgiu em virtude da nova espécie *A. punctata* ter sido reportada com o código NCMB74 (equivalente a ATCC23309), mas esta linhagem não consta na lista de espécies aprovadas. Além disso, NCMB74 é também o código designado para a linhagem referência de *A. eucrenophila*. Apesar de *A. punctata* e *A. caviae* serem consideradas espécies sinônimos, considerando o número de buscas em bancos de dados o nome *A. caviae* é o mais utilizado (Martin-Carnahan & Joseph, 2005).

Por fim, *A. allosaccharophila* foi contestada intermitentemente ao longo anos. Esta nova espécie foi proposta com base em estudos realizados empregando três linhagens, uma das quais, isolada de fezes humanas. Um aspecto preocupante observado

foi a ausência de qualquer homologia entre a maioria das espécies de *Aeromonas* incluindo, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trola*. Este fato chama atenção devido o elevado grau de similaridade verificado entre todas as espécies de *Aeromonas*, empregando o gene *16S rRNA*. Além disso, estudos utilizando hibridização DNA-DNA e avaliações das relações filogenéticas utilizando o gene *dnaJ*, sugerem que *A. allosaccharophila* na verdade se trata de um sinônimo heterotípico de *A. veronii* (Huys *et al.*, 2002; Nhung *et al.*, 2007).

Quando uma nova espécie é descrita, é importante que ela possa ser distinguida fenotipicamente da espécie imediatamente mais relacionada. No entanto, é preciso cuidado, pois muitos testes utilizados para caracterização podem ser empregados de forma isolada e caso não sigam um critério definido podem gerar resultados significativamente distintos. Desta forma, esforços conjuntos devem ser realizados para padronizar todos os testes e métodos-chave empregados na identificação de espécies do gênero *Aeromonas* (Janda & Abbott, 2010).

3.2 Distribuição de bactérias do gênero *Aeromonas*

As bactérias deste gênero se distribuem de forma ampla na natureza, sendo comumente encontradas em muitos ecossistemas aquáticos e praticamente em todas as latitudes (Handfield *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Janda & Abbott, 1998; Chacón *et al.*, 2003). Atualmente, bactérias do gênero *Aeromonas* podem ser isoladas de rios, lagos, água marinha (principalmente em ambiente estuarínico), água potável, água subterrânea e esgotos em vários estágios de tratamento, ao redor de todo o mundo. Segundo Holmes *et al.*, (1996), as concentrações de *Aeromonas* spp. relatadas nestes ambientes variam de baixas (<1 UFC/mL, em águas subterrâneas, água potável e água marinha) a altas (10⁸ UFC/mL, em esgoto bruto ou lodo de esgoto doméstico).

Tratando-se especificamente de águas tratadas e próprias para consumo, a

presença de *Aeromonas* spp. pode representar um risco principalmente para pessoas imuno-comprometidas, onde a exposição crônica a estes organismos normalmente ocasiona o surgimento de doenças, dentre elas septicemias e gastroenterites (Laclerc *et al.*, 2002).

Estudos relacionados à epidemiologia das gastroenterites vinculadas à presença de *Aeromonas* spp. têm estabelecido a água como principal veículo de transmissão direta ou indireta (Neves *et al.*, 1990; Hänninen & Sitonen, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Bulhões & Rossi Júnior, 2002; Figueras, 2005). Neste sentido, um estudo realizado por Fuzihara *et al.* (1995) verificou a ocorrência de *Aeromonas* spp. em 4,6% e 42,4% das amostras de água tratada e não tratada coletadas no interior do Estado de São Paulo, respectivamente, e concluíram que o consumo dessas águas pode representar um risco para saúde dos consumidores. A esse respeito, Burke *et al.* (1984), na Austrália, em um sistema de distribuição de água não clorada, encontraram *Aeromonas* spp. em 34% das amostras analisadas. Das *Aeromonas* spp. isoladas 9,9% eram provenientes do sistema de captação, 51,7% do armazenamento e 33% do sistema de distribuição. Hande *et al.* (2006), em um estudo sazonal em 11 reservatórios de água utilizados para consumo humano, na Índia, identificaram a presença de *Aeromonas* spp. em 54,5% dos reservatórios sendo que 36,6% demonstraram consistência em todos os períodos analisados. A análise de água de abastecimento e escoamento de abatedouros de bovinos em Porto Alegre (RS) permitiu constatar a presença de *Aeromonas* spp. em 21,4% das amostras, sugerindo como fonte de contaminação a água de abastecimento (Bizani & Brandelli, 2001).

Bactérias do gênero *Aeromonas* também são frequentes em peixes, anfíbios, répteis, aves, frutos do mar, fezes de animais podendo ser encontradas, inclusive em fezes humanas (Koneman *et al.*, 2001; Zanella, 2002; Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et*

al., 2003; Figueras, 2005). Lucena (2007), avaliando carcaças suínas, observou uma elevada incidência de bactérias do gênero *Aeromonas*. As espécies mais prevalentes encontradas nestas carcaças foram *A. media* (35,7%), seguida por *A. hydrophila* (26,2%) e *A. caviae* (21,4%). Cabe ressaltar que neste mesmo estudo, a avaliação de fatores de virulência permitiu constatar que a maioria dos isolados apresentou mais de um fator de virulência, evidenciando assim seu potencial patogênico.

Na Turquia, estudos reportaram a presenças de diferentes espécies de *Aeromonas* spp. no conteúdo gastrointestinal de animais saudáveis, entre eles, ovelhas, gado, e cavalos, a uma frequência variando entre 5 a 10% (Ceylan *et al.* 2009). Em outro estudo conduzido por Ghenghesh *et al.* (1999), analisando cães e gatos domésticos, foi possível isolar *Aeromonas* spp. em 10,8% dos cães e 6,7% dos gatos avaliados.

As *Aeromonas* spp. também são encontradas em um grande número de alimentos frescos tanto de origem animal quanto vegetal, além de alimentos processados, inclusive aqueles refrigerados (Buchanan & Palumbo, 1985; Saad *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000; Figueras, 2005). Costa & Rossi Júnior (2002), avaliaram 200 amostras de diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frangos e isolaram *Aeromonas* spp. em 36% das amostras de penas, 56% das amostras de fezes, 72% de carcaças evisceradas, não evisceradas, e resfriadas, e 80% em de água de pré-resfriamento. Neste trabalho, não foram isoladas *Aeromonas* spp. na água de abastecimento da indústria e da água do tanque de escaldagem, indicando que estas bactérias estavam vinculadas aos próprios animais.

Em peixes, Castro-Escarpulli *et al.* (2003) evidenciaram a presença de *Aeromonas* spp. em 32,8% das 250 amostras de peixes congelados de água doce, comercializados no México. A caracterização bioquímica dos isolados identificou as

espécies *A. salmonicida* (35,36%), *A. hydrophila* (20,73%), *A. caviae* (17,07%), *A. veronii* biovar. *sobria* (13,42%) e *A. eucrenophila* (13,42%). Por outro lado, um estudo realizado na Turquia, *Aeromonas* spp. foram isoladas de apenas 15,8% dos salmões retirados do Mar Negro (Dugenci & Candan, 2003). As análises de mexilhões comercializados no Rio de Janeiro mostraram a presença de *Aeromonas* spp. em 86% das amostras, sendo *A. media* a espécie mais frequente (Pereira *et al.*, 2004). Na Espanha, Miñana-Galbis (2002) encontraram 45,5% de *A. caviae* em amostras de moluscos bivalves.

De um modo geral, bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam uma ampla distribuição no ambiente. A Tabela 2 relaciona de uma forma simplificada a distribuição das espécies de *Aeromonas* em relação às fontes ambientais avaliadas.

Tabela 2. Distribuição relativa de espécies de *Aeromonas* no ambiente.

Espécies	Presença de espécies ^a						
	Vertebrados		Invertebrados			Água	
	Primatas	Outros	Moluscos ^b	Artropodes ^c	Outros ^d	Fresca	Salina ^e
<i>A. allosaccharophila</i>	±	±	—	—	—	—	—
<i>A. aquariorum</i>	—	±	—	—	—	±	—
<i>A. bestiarum</i>	+	±	±	—	—	++	—
<i>A. bivalvium</i>	—	—	±	—	—	—	—
<i>A. caviae</i>	+++	+++	++	++	—	++	+++
<i>A. encheleia</i>	—	++	++	—	—	+	—
<i>A. eucrenophila</i>	±	+	+	—	—	+	—
<i>A. hydrophila</i>	+++	+++	±	±	+	+++	++
<i>A. jandaei</i>	+	++	±	—	—	±	—
<i>A. media</i>	+	—	++	—	—	+	—
<i>A. molluscorum</i>	—	—	±	—	—	—	—
<i>A. popoffii</i>	±	—	—	—	—	+	—
<i>A. salmonicida</i>	+	+++	—	—	—	++	—
<i>A. schubertii</i>	+	±	—	—	—	—	—
<i>A. simiae</i>	±	—	—	—	—	—	—
<i>A. sobria</i>	—	++	—	—	—	±	—
<i>A. tecta</i>	±	±	—	—	—	—	—
<i>A. trota</i>	+	—	—	—	—	—	±
<i>A. veronii</i>	+++	++	—	±	++	±	++

^a(-) Nenhum reporte; (±) reporte raro; (+) reporte incomum; (++) reporte comum; (+++) reporte frequente. ^b Incluindo bivalves e caracóis; ^c Insetos e aracnídeos; ^d Incluindo sanguessugas; ^e Estuários; ^f Excluindo peixes, mariscos e crustáceos.

Esta ampla distribuição deve-se à sua capacidade de utilização de distintos substratos e tolerância a condições de estresse. As *Aeromonas* spp. apresentam capacidade de crescimento em uma ampla escala de condições ambientais como: valores de pH variando entre 4,0 e 10,0, concentrações salinas de até 6,5% (p/v) e temperatura de crescimento entre 4°C e 42°C, com ótimo entre 28 e 37°C (Delamare *et al.*, 2000; Garrit *et al.*, 2001; Zucolotto *et al.*, 2006).

Cabe ressaltar que as variáveis que determinam a distribuição e a incidência de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de águas, alimentos ou mesmo isolados clínicos, assim como suas propriedades de virulência associadas, podem ser alteradas de acordo com a região geográfica, tornando-se necessário uma avaliação cautelosa a respeito das características deste gênero (Bizani & Brandelli, 2001).

3.3 Aspectos clínicos associados ao gênero *Aeromonas*

São poucas as bactérias Gram-negativas capazes de concorrer com as espécies que constituem o gênero *Aeromonas* em relação ao escopo e amplitude de infecções humanas que possam causar. As bactérias deste gênero são responsáveis por causar infecções intestinais e extra intestinais, que vão desde gastroenterites agudas, até condições mais preocupantes como septicemia, fasciíte necrótica e mionecrose (Janda & Abbott, 1996).

De acordo com a frequência observada, as infecções clínicas causadas por *Aeromonas* spp. são classificadas em quatro principais categorias; (i) síndromes do trato gastrointestinal; (ii) infecções em feridas ou tecidos moles; (iii) discrasias transmitidas pelo sangue, e (iv) todo o restante de infecções menos frequentes, provenientes de alimentos contaminados (Janda & Abbott, 2010). Os dados disponíveis sugerem que a maioria dos isolados de *Aeromonas* spp. mesofílicas são adquiridos mediante

consumo/contato com água contaminada ou através da ingestão de alimentos que são naturalmente expostos a estas bactérias através de processos de irrigação ou outras operações envolvendo a sua manipulação. Em adição a estes produtos alimentícios, moluscos bivalves, tais como ostras e mexilhões são comumente encontrados em ambientes estuarinos coexistindo com estes microrganismos, onde através do seu processo de alimentação e consequente filtragem da água, acabam por concentrar estas bactérias em seu corpo.

Outro risco de infecção por *Aeromonas* spp. decorre de eventos com origem zoonótica. Acidentes envolvendo mordidas de répteis apresentam um longo histórico de associação com infecções secundárias causadas por *Aeromonas* spp. , no entanto, casos de infecções provenientes de acidentes com animais menos comuns, como ursos, tem sido reportados com maior frequência (Angel *et al.*, 2002; Kunimoto *et al.*, 2004).

Embora o trato gastrointestinal seja o local mais comum do qual *Aeromonas* spp. são isoladas, o seu papel etiológico como agente causador de diarreia é um tanto problemática (Janda & Abbott, 2006). A falta de evidencias definitivas da associação de *Aeromonas* spp. como um agente etiológico causador de diarreia pode estar associado ao fato de que os casos de diarreia associados a esta bactéria ocorrem em surtos, os quais, na maioria das vezes não são notificados (Joseph & Carnahan, 2000).

Outro fato que torna problemática a associação desta bactéria com infecções gastrointestinais está relacionado ao método postulado por Henle-Koch, no qual ainda não existe um modelo animal confiável para a aplicabilidade e consequente confirmação aplicável à *Aeromonas* spp. (Kelleher & Kirov, 2000). No entanto, as evidencias que suportam *Aeromonas* spp. como patógenos intestinais decorrem de relatos de casos e investigações epidemiológicas de casos controlados (Figueras, *et al.*, 2000; Figueras, 2005).

A mais séria complicação gastrointestinal potencialmente resultante de infecções causadas por *Aeromonas* spp. é a síndrome úrico-hemolítica (HUS). Embora este quadro clínico possa ser apontado por alguns autores como incerto, o simples fato de isolar *Aeromonas* spp. verocitotoxigenicas de crianças ou adultos com HUS não implica em mera casualidade, uma vez que a maioria das linhagens de *Aeromonas* spp. hemolíticas produz uma citolisina com atividade sobre muitas células eucarióticas, inclusive células VERO (Handfield, 1996; Fang *et al.*, 1999; Janda & Abbott, 2010).

Outra infecção invasiva associada ao gênero *Aeromonas* é a septicemia. Três espécies (*A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar. *sobria*) são responsáveis por mais de 95% das septicemias causadas por bactérias deste gênero (Janda *et al.*, 1994). No entanto, outras espécies foram documentadas como agentes causadores deste tipo de infecção, dentre elas, *A. jandaei*, *A. veronii* biovar. *veronii* e *A. schubertii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1988; Janda *et al.* 1994; Mencacci *et al.*, 2003). Um fato a não ser negligenciado consiste em considerar que septicemias causadas por *Aeromonas* são mais frequentes em pessoas imunocomprometidas atingindo índices de infecção superiores a 80%, nestes casos.

Infecções associadas à *Aeromonas* spp. também são comuns, porém menos frequentes, em eventos traumáticos. A infecção por bactérias deste gênero, nestes casos, pode levar a necessidade de amputações de membros e em casos mais graves à morte por septicemia (Voss *et al.*, 1992; Adamski *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2008).

De um modo geral, bactérias do gênero *Aeromonas* podem estar associadas ainda a infecções de pele e tecidos mole (SSTIs). Este tipo de infecção apresenta um variado grau de complexidade, apresentando sintomas tais como, lesões postulares, e em casos mais graves, fascíte necrotizante podendo evoluir para mionecrose (Janda & Abbott, 2010). Hiransuthikul *et al.*, (2005) constataram que *Aeromonas* spp. foi o

patógeno mais comumente identificado, contabilizando 22,6% de todos os isolados identificados em 396 pessoas com infecções de pele e tecidos mole ocorrido após um tsunami na Tailândia.

Infecções intra-abdominais também são um problema sério causado por *Aeromonas* spp.. Dentre estas infecções destacam-se as peritonites, infecções hepatobiliares e infecções relacionadas ao sistema pancreático (Clark & Chenoweth, 2003; Huang *et al.*, 2006; De Gascun *et al.*, 2007). As infecções peritônicas causadas por *Aeromonas* podem ser de ordem primária ou secundária. As peritonites primárias são mais frequentes em pessoas com alguma doença no fígado acompanhada de bacteremia, enquanto que peritonites secundárias podem ocorrer em virtude de infecções ocasionadas por *Aeromonas* juntamente a outras bactérias, entre elas, *E. coli* e *K. pneumoniae* (Huang *et al.*, 2006). As espécies mais comumente associadas a este tipo de infecção são *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar. *sobria*.

As aeromonas também podem ser encontradas em secreções provenientes do trato respiratório indicando sua capacidade de causar complicações das vias aéreas. A mais frequente complicação respiratória associada a bactérias do gênero *Aeromonas* é a pneumonia. As pneumonias associadas à *Aeromonas* spp. estão relacionadas principalmente a eventos de quase afogamento e ingestão involuntária de grande quantidade de água contaminada (Miyake *et al.*, 2000; Bossi-Küpfer *et al.*, 2007). No entanto, pacientes internados por longos períodos de tempo, com imunidade comprometida, ou mesmo aqueles acometidos por outras doenças, podem desenvolver este tipo de infecção (Murata *et al.*, 2001).

Ocasionalmente, *Aeromonas* spp. podem causar infecções urogenitais, porém, este tipo de infecção é pouco comum e os relatos referentes a estes casos indicam as espécies *A. veronii* biovar. *sobria*, *A. caviae* e *A. popoffii* como os principais agentes

causais (Hsueh *et al.*, 1998; Hua *et al.*, 2004; Al-Benwan, *et al.*, 2007).

Além destas infecções, diferentes espécies de *Aeromonas* podem causar doenças oculares que variam de endoftalmite até queratite e ulcerações córneas, sendo *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*, as principais espécies relacionadas a este tipo de infecção (Puri, *et al.*, 2003; Pinna *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2007).

O grande número de potenciais infecções causadas por bactérias do gênero *Aeromonas* ocorrem em virtude de sua elevada gama de fatores de patogenicidade, os quais podem explicar o papel destes microrganismos em distintas infecções.

3.4 Fatores de patogenicidade associados ao gênero *Aeromonas*.

De uma forma simples, patogenicidade pode ser definida como a capacidade de um microrganismo causar doenças em um hospedeiro em particular. No entanto, a virulência pode ser definida como a habilidade de uma linhagem em particular causar doenças em uma determinada situação (Casadevall & Pirofski, 1999).

Os mecanismos de patogenicidade das aeromonas são considerados multifatoriais. Algumas linhagens de *Aeromonas* spp. possuem uma ampla gama de fatores de virulência e alta capacidade invasiva, sendo estes fatores mais frequentes em amostras clínicas do que em amostras ambientais (Marian, 1990; Chacón *et al.*, 2003; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Janda & Abbott, 2010; Tomás, 2012). Dentre os principais fatores de virulência associados à *Aeromonas* spp., estão: diferentes formas de fimbria/pili, cápsulas, lipopolissacarídeos (LPS), toxinas e enterotoxinas (hemolíticas, citotônicas e citotóxicas), proteases, nucleases, lipases e outras proteínas com papel patogênico ainda pouco definido (Martins *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2006; Jangid, *et al.*, 2007), além da capacidade de formação de biofilme (Erova *et al.*, 2006).

A fimbria/pili consiste em estruturas em forma de filamento, com capacidade adesiva localizada na superfície da bactéria. Apresentam funções relacionadas à ligação a fagos, transferência de DNA, formação de biofilme, agregação celular, invasão em células hospedeiras e mobilidade. Em *Aeromonas* dois distintos tipos de fimbria/pili foram descritos, sendo caracterizados morfolologicamente como curtos e rígidos (S/R) e longos e ondulados (L/W) (Tomás, 2012).

Fimbria/pili do tipo S/R são encontradas em grande número, com tamanho variando entre 0,6 a 2 µm, com epitopos comuns nas diferentes espécies analisadas. Este tipo de fimbria/pili é capaz de causar auto-agregação, mas não é capaz de causar hemaglutinação ou adesão a células do epitélio intestinal. Em alguns isolados clínicos, estes tipos de fimbria/pili podem ser induzidos por condições ambientais (temperatura < 22°C, em meio líquido). Já as fimbria/pili do tipo L/W, são longas, flexíveis e finas (4-7 nm) e apresentam capacidade de hemaglutinação. Este tipo particular de fimbria/pili, corresponde a classe de pili tipo IV (Pepe *et al.* 1996), e é considerado uma importante estrutura de adesão a células epiteliais, estando envolvido na formação de biofilme e mobilidade celular. Dois diferentes fimbria/pili correspondentes a classe IV são descritos em *Aeromonas* e estão associados à gastroenterites, sendo eles, o *bundle-forming pili* (Bfp), envolvido na adesão de células intestinais e exibindo homologia na sequência N-terminal com pili manose-sensível de *V. cholerae*, e o pili (Tap), exibindo alta homologia com o pili tipo IV de *Pseudomonas* spp. e espécies patogênicas de *Neisseria* spp. (Tomás, 2012).

A cápsula corresponde a uma estrutura de polissacarídeos altamente hidrofílica que recobre a membrana externa da célula bacteriana. Esta estrutura foi descrita como um dos mais importantes fatores de virulência em muitas bactérias patogênicas, atuando como uma barreira a entrada de toxinas ou antimicrobianos hidrofóbicos (Merino &

Tomás, 2010). No entanto, a produção desta cápsula em *Aeromonas* é modulada por condições ambientais, principalmente, relacionadas às condições de crescimento destes organismos. *A. salmonicida* é capaz de formar a cápsula *in vivo* e em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*), mas sua formação não foi detectada em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*). Já algumas linhagens de *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar. *sobria* são capazes de formar cápsulas apenas quando crescidas em meio de cultivo rico em glicose (Martínez *et al.*, 1995).

Os LPS consistem em glicoconjugados de superfície, formados por um lipídio A, um oligossacarídeo central e um polissacarídeo O-específico ou antígeno-O, com função protetora contra a resposta imune por parte do hospedeiro (Whitfield & Valvano, 1993). Estudos caracterizando a composição dos LPS e sua relação com a virulência foram realizados, principalmente, em *A. salmonicida*, *A. hydrophila* e *A. caviae*, indicando uma elevada complexidade estrutural, característica de bactérias com importante relevância clínica (Dooley *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Bactérias do gênero *Aeromonas* são, reconhecidamente, produtoras de uma grande variedade de exotoxinas. No entanto, apenas algumas linhagens são capazes de sintetizar tais toxinas e mesmo assim, apenas sob certas condições de crescimento. Dois tipos de enterotoxinas são descritos em *Aeromonas*, sendo estas consideradas citotóxicas ou citotônicas (Tomás, 2010). Estudos realizados por Albert *et al.* (2000) identificaram três genes correspondentes a enterotoxinas: *act*, que codifica uma enterotoxina citotóxica (Act), e os genes *alt* e *ast*, responsáveis por duas enterotoxinas citotônicas (Alt e Ast).

Act é uma enterotoxina que possui atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica (Asao, *et al.*, 1984; Chopra & Houston, 1999). Em *A. hydrophila*, Act

desempenha um importante papel em infecções, induzindo o início da sinalização em células eucarióticas, a qual leva a produção de mediadores de inflamação em macrófagos e em células do epitélio humano, contribuindo para a ocorrência de apoptose (Howard & Buckley, 1986; Ferguson *et al.* 1997; Xu *et al.* 1998; Galindo *et al.* 2006). Já, as duas enterotoxinas citotônicas produzidas por *Aeromonas*, apresentam diferente massa molecular e uma variada reatividade a anticorpos antitoxina colérica. Estas enterotoxinas citotônicas são divididas em enterotoxinas termossensíveis sem reatividade cruzada com anticorpos antitoxina colérica, codificadas pelo gene *Alt*, e enterotoxinas termoestáveis com reatividade cruzada com anticorpos antitoxina colérica, codificadas pelo gene *Ast* (Chopra & Houston, 1999).

Além das enterotoxinas hemolíticas citotóxicas, algumas linhagens de *Aeromonas* spp. produzem ainda outras duas classes de hemolisinas sem propriedade enterotóxica, sendo descritas como α -hemolisinas e β -hemolisinas (Thelestam & Ljungh, 1981).

De um modo geral, *Aeromonas* spp. são capazes de secretar uma grande variedade de enzimas extracelulares as quais desempenham um papel vital na ecologia, sobrevivência e patogenicidade destes organismos. Algumas das enzimas mais comuns, secretadas por *Aeromonas* spp. , são as lipases. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos livres e glicerol. O interesse por estas enzimas tem aumentado devido ao seu papel como importante fator de virulência, já que estas são capazes de interagir com os leucócitos humanos e afetar várias funções do sistema imune através da liberação de ácidos graxos (Chuang *et al.*, 1997).

A principal lipase extracelular (Lip) de *A. hydrophila*, codificada pelo gene *lipA*, apresenta massa molecular de 80 kDa e possui capacidade de hidrolisar ésteres para triacilgliceróis (Chuang *et al.*, 1997). No estudo realizado por Chacón *et al.* (2003) foi

possível observar uma elevada prevalência do gene *lipA* (94,5%) em um total de 234 isolados de *Aeromonas* spp. analisados através da técnica da PCR. Em outro estudo, Chacón *et al.* (2003), constataram que 100% dos isolados de *Aeromonas* spp. analisados, apresentaram atividade lipolítica quando plaqueados em meio ágar LB (Luria Bertani) suplementado com 0,5% de tributirina. De certa forma, estes resultados têm apontando como possibilidade, a utilização deste gene na identificação rápida de espécies do gênero, no entanto, sua eficácia discriminatória a nível específico necessita de mais estudos.

Além da proteína Lip, as aeromonas são capazes de produzir outra lipase extracelular, codificada pelo gene *lipH3*. Esta é capaz de degradar derivados do *p*-nitrofenil, bem como triacilgliceróis de C₄ a C₈ (Chuang *et al.*, 1997). Outras duas enzimas com atividade fosfolipídica, foram caracterizadas em *Aeromonas*: a fosfolipase C (codificada pelo gene *apl-1*) e a fosfolipase A1 (codificada pelo gene *pla*) (Watanabe *et al.*, 2004).

Outro grupo de enzimas extracelulares apontadas como importante fator de virulência, são as proteases. Estudos indicam que proteases extracelulares produzidas por este microrganismo, desempenham um importante papel inicial na invasão e no estabelecimento desta bactéria em infecções (Leung & Stevenson, 1988). Além disso, algumas destas enzimas desempenham um papel fundamental na ativação de outros fatores de virulência, dentre eles a hemolisina (Howard & Buckley, 1985). Dois distintos tipos de proteases, uma metaloprotease termoestável e uma serino-protease termossensível, foram identificadas em vários isolados de *A. hydrophila* assim como, de outras espécies do gênero (Nieto & Ellis 1986; Leung & Stenvenson, 1988).

Um grande número de proteases extracelulares foi identificado em diferentes espécies de *Aeromonas*. Esteve & Birbeck (2004), identificaram uma serino-protease de

aproximadamente 68 KDa ativa contra caseína e distintas bandas (60, 44 e 31 KDa) representando metaloproteases termoestáveis com atividade sobre caseína e elastina, identificadas em uma linhagem de *A. hydrophila*. Já Loewy *et al* (1993), identificaram uma zinco-metaloprotease de 19 KDa em uma outra linhagem de *A. hydrophila* isolada do intestino de *Hirudo medicinalis*.

Outras duas proteases de mesma massa molecular (19 KDa) foram caracterizadas, correspondendo a uma Zn/Fe-metaloprotease termoestável, identificada na linhagem Ae6 de *A. caviae*, e uma metaloprotease (AsaP1) identificada em *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (Nakasone *et al.*, 2004 Arnadottir *et al.*, 2009). Neste sentido uma protease caracterizada como serino protease, com massa molecular de 22 KDa, termoestável foi identificada na linhagem B32 de *A. hydrophila* (Rodriguez *et al*, 1992).

Por fim um trabalho avaliando a diversidade de proteases extracelulares de *Aeromonas* permitiu a identificação de conjunto de metalo e serino-proteases com atividades sobre caseína e gelatina com massas moleculares aparentes variando entre 22 a 93 KDa, com elevada diversidade entre os isolados das diversas espécies de *Aeromonas* avaliadas (Zacaria, *et al.* 2010). Outro resultado importante observado foi que isolados de *Aeromonas* apresentaram variação quanto ao perfil de bandas com atividade proteolítica sobre gelatina, caseína, ovoalbumina, soro-albumina bovina, colágeno, fibrinogênio, elastina e γ -globulina, evidenciando sua elevada capacidade em degradar estes substratos. Dentre as proteases extracelulares de *Aeromonas*, a serino protease de 56 KDa e uma protease de 22 KDa exibiram atividades sobre a maior parte dos substratos (Zacaria, 2009).

Alguns isolados de *A. hydrophila* apresentam uma elastase de aproximadamente 38 KDa com atividade sobre caseína e elastina, e com elevada similaridade com

metalo-proteases produzidas por outros microrganismos, especialmente, com a elastase de *Pseudomonas aeruginosa* (52% -identidade), zinco-metaloprotease de *Helicobacter pylori* (61% -identidade), e proteases de algumas espécies de *Vibrio* (52 a 53% -identidade) (Cascón *et al.*, 2000).

Outro conjunto de enzimas extracelulares produzidas por *Aeromonas* são as nucleases. Embora estas enzimas possam desempenhar um importante papel nutricional, em alguns casos são consideradas fatores de patogenicidade. Em *Aeromonas* um pequeno número de trabalhos foram realizados objetivando a caracterização destas enzimas. Os estudos de nucleases até o momento limitam-se apenas a três linhagens de *A. hydrophila* e uma de *A. salmonicida*, não existindo até o presente um levantamento amplo destas enzimas no gênero ou mesmo estudos que comprovem de forma definitiva seu papel em termos nutricionais ou relativo a eventos envolvendo patogenicidade.

3.5 Nucleases

Todos os organismos apresentam um conjunto de enzimas denominadas nucleases, capazes de interagir com ácidos nucléicos e hidrolisar suas ligações fosfodiéster. De um modo geral, as nucleases são definidas como enzimas que catalisam a hidrólise de ligações fosfodiéster em locais específicos ou aleatoriamente ao longo de uma molécula de DNA ou RNA (Zhang & Song, 2008).

As nucleases são enzimas que participam de processos metabólicos relacionados à replicação, recombinação e reparo do DNA. Algumas nucleases desempenham alterações estruturais em ácidos nucleicos, como por exemplo; topoisomerização, recombinação sítio específica, processamento e maturação de RNA, bem como a formação de RNAs de interferência (RNAi) (Yang, 2011).

Como os ácidos nucléicos são compostos ricos em carbono, fósforo e nitrogênio, postula-se que as nucleases desempenham um importante papel nutricional em muitos

microrganismos, tais como, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella oneidensis*, entre outros (Palchevsky & Finkel, 2009; Mulcahy *et al.*, 2010; Heun *et al.*, 2012).

Por outro lado, a habilidade das nucleases reconhecerem diferentes estruturas no DNA e no RNA, faz destas enzimas importantes ferramentas analíticas empregadas na caracterização da estrutura de ácidos nucléicos, mapeamento de mutações e estudo de interações do DNA ou RNA com uma grande variedade de agentes intercalantes (Kacian & Spiegelman, 1974; Legerski *et al.*, 1978; Fox & Waring, 1987; Przykorska *et al.*, 1989).

A classificação das nucleases é complexa. Ao longo do tempo, diferentes modelos de classificação foram propostos na tentativa de agrupá-las (Kunitz, 1950; Laskowski, 1967), no entanto, com a descoberta de novas nucleases, estes modelos de classificação tornaram-se inadequados.

Em virtude da dificuldade de classificação das nucleases, Bernard (1969) e Laskowski (1985) sugeriram um modelo baseado na: (i) natureza do substrato hidrolisado (DNA, RNA); (ii) tipo de ação sobre os polinucleotídeos (exonucleases ou endonucleases); (iii) natureza dos produtos hidrolisados formados (mono ou oligonucleotídeos com terminações 3'- ou 5'- fosfatadas); e (iv) natureza da ponte hidrolisada. Este conjunto de critérios elimina muitos dos problemas na classificação das nucleases, possibilitando acomodar enzimas com propriedades distintas dentro de um mesmo grupo (Mishra, 2002). Entretanto, este modelo de classificação não diferencia nucleases que clivam ácidos nucléicos com fita simples ou ácidos nucléicos constituídos por fita dupla.

De um modo geral, as nucleases podem ainda ser divididas em dois grupos: (i) nucleases açúcar específico (desoxiribonucleases e ribonucleases) e (ii) nucleases

açúcar não-específico (Mishra, 2002).

Atualmente as nucleases, de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, são enzimas pertencentes à classe 3, das hidrolases e a subclasse 3.1, representadas por enzimas que atuam sobre pontes de ésteres, constituindo assim a grande família EC 3.1. Detalhes relacionados aos tipos de nucleases e sua classificação são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Nucleases e sua numeração de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

Grupos de Nucleases	Tipos de Nuclease	EC nº
Exodesoxiribonuclease com fosfomonoésteres -5'	Exodesoxiribonuclease I	3.1.11.1
	Exodesoxiribonuclease III	3.1.11.2
	Exodesoxiribonuclease (induzida por Fago λ)	3.1.11.3
	Exodesoxiribonuclease (induzida por Fago SP3)	3.1.11.4
	Exodesoxiribonuclease V	3.1.11.5
	Exodesoxiribonuclease VII	3.1.11.6
Exoribonucleases com fosfomonoésteres -5'	Exoribonuclease II	3.1.13.1
	Exoribonuclease H	3.1.13.2
	Oligonucleotidase	3.1.13.3
	Ribonuclease poli (A) específica	3.1.13.4
	Ribonuclease D	3.1.13.5
Exonuclease ativa contra DNA/RNA com fosfomonoésteres -5'	Exonuclease <i>venom</i>	3.1.15.1
Exonuclease ativa contra DNA/RNA com fosfomonoésteres -3'	Exonuclease <i>spleen</i>	3.1.16.1
Endodesoxiribonuclease com fosfomonoésteres -5'	Desoxiribonuclease I	3.1.21.1
	Desoxiribonuclease IV (induzida por Fago T ₄)	3.1.21.2
	Desoxiribonuclease I tipo - específica	3.1.21.3
	Desoxiribonuclease II tipo - específica	3.1.21.4
	Desoxiribonuclease III tipo - específica	3.1.21.5
	Endodesoxiribonuclease CC	3.1.21.6
	Desoxiribonuclease V	3.1.21.7
Endodesoxiribonuclease com fosfomonoésteres -3'	Desoxiribonuclease II	3.1.22.1
	<i>Aspergillus</i> Desoxiribonuclease K ₁	3.1.22.2
	Endodesoxiribonuclease <i>crossover</i>	3.1.22.4
	Desoxiribonuclease X	3.1.22.5
Sítio-específica Endodesoxiribonuclease específica para bases alteradas	Desoxiribonuclease (dímeros de pirimidina)	3.1.25.1
Endoribonuclease com fosfomonoésteres -5'	<i>Physarum palycephalum</i> ribonuclease	3.1.26.1

	Ribonuclease alfa	3.1.26.2
	Ribonuclease III	3.1.26.3
	Ribonuclease H	3.1.26.4
	Ribonuclease P	3.1.26.5
	Ribonuclease IV	3.1.26.6
	Ribonuclease P4	3.1.26.7
	Ribonuclease M5	3.1.26.8
	Ribonuclease (poli-U específica)	3.1.26.9
	Ribonuclease IX	3.1.26.10
	tRNase Z	3.1.26.11
	Ribonuclease E	3.1.26.12
	Retroviral ribonuclease H	3.1.26.13
Endoribonuclease com fosfomonoesteres -3'	Ribonuclease T ₂	3.1.27.1
	<i>Bacillus subtilis</i> ribonuclease	3.1.27.2
	Ribonuclease T ₁	3.1.27.3
	Ribonuclease U ₂	3.1.27.4
	Ribonuclease pancreática	3.1.27.5
	Enterobacter ribonuclease	3.1.27.6
	Ribonuclease F	3.1.27.7
	Ribonuclease V	3.1.27.8
	tRNA intro-endonuclease	3.1.27.9
	rRNA endonuclease	3.1.27.10
Endodesoxiribonuclease ativa contra DNA/RNA com fosfomonoesteres -5'	<i>Aspergillus</i> nuclease S ₁	3.1.30.1
	<i>Serratia marcescens</i> nuclease	3.1.30.2
Endodesoxiribonuclease ativa contra DNA/RNA com fosfomonoesteres -3'	<i>Micrococcal</i> nuclease	3.1.31.1

Conforme pode ser observado na Tabela 3, as nucleases constituem um grupo de enzimas bastante heterogêneo e foram isoladas de uma grande variedade de organismos, incluindo microrganismos, plantas e animais (Desai & Shankar, 2003). Muitas destas enzimas são intracelulares, entretanto, grande parte das nucleases microbianas encontra-se no espaço periplasmático ou são secretadas para o meio extracelular, sendo descritas como nucleases extracelulares.

3.5.1 Nucleases microbianas

As nucleases microbianas desempenham um importante papel no metabolismo de ácidos nucléicos. Como mencionado anteriormente, estas enzimas atuam em uma

série de processos biológicos, tais como, restrição do DNA, replicação, reparo, recombinação, transposição, transcrição e topoisomerização, reciclo de nucleotídeos, processamento de RNAs mediante *splicing* (eucariotos) e geração de RNAs de interferência, os quais podem participar no controle da expressão gênica (Mishra, 2002). Além disso, as nucleases são apontadas como barreiras à entrada de DNA exógeno mediante transformação ou eletroporação, refletindo em problemas relacionados à manipulação genética em algumas bactérias (Marcus *et al.*, 1990; Focareta & Manning, 1991). As nucleases são enzimas que podem atuar como componentes essenciais nos mecanismos de defesa microbianos (Yang, 2011). Outra consequência da presença de nucleases consiste na dificuldade de isolamento de DNA genômico ou plasmidial intacto (Moulard *et al.*, 1993), ou ainda na degradação de produtos de PCR obtidos através de ampliações do DNA proveniente de células lisadas (Gibson & McKee, 1993, Nakajima *et al.*, 1994). Em alguns microrganismos, estas enzimas são reconhecidas como fatores de virulência ou como enzimas que participam no desenvolvimento de infecção no hospedeiro (Sumby *et al.*, 2004; Nam & Joh, 2007; Bernds *et al.* 2010).

Nucleases extracelulares foram evidenciadas em uma grande variedade de microrganismos, entre eles, *Serratia marcescens* (Ball *et al.*, 1987, Benedik & Strych, 1998), *Alteromonas espejiana* (Lau & Gray, 1979; Gray *et al.*, 1981), *Staphylococcus aureus* (Brakstad *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* (Kanamori *et al.*, 1973), *Vibrio* sp. (Maeda & Taga, 1976), *Vibrio cholerae* (Blokesch & Schoolnik, 2008), *Lysobacter enzymogens* (von Tigerstrom, 1980), *Pseudomonas* sp. (Sadovski & Levin, 1969; Gray *et al.*, 1975), *Proteus mirabilis* (Salikhova *et al.*, 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (Chow & Resnick, 1987), *Anabaena* sp. PCC 7120 (Muro-Pastor *et al.*, 1992), *Syncephalastrum racemosum* (Chen *et al.*, 1993), *Erwinia chrysanthemi* (Moulard *et al.*,

1993), *Escherichia coli* (Jekel & Wackernagel, 1995), *Cunninghamella echibulata* (Ho *et al.*, 1998), *Streptomyces antibioticus* (Nicieza *et al.*, 1999), *Rhizopus stolonifer* (Rangarajan & Shankar, 1999) *Basidiobolus haptosporus* (Desai & Shankar, 2007), *Thermus thermophilus* HB8 (Takahashi & Uchida, 1978), *Lactobacillus* sp. (Miller *et al.*, 1971) e *Aeromonas hydrophila* (Dodd & Pemberton, 1996), entre outros.

Apesar de nucleases extracelulares terem sido evidenciadas em muitas bactérias, poucos genes que codificam estas enzimas foram clonados e caracterizados. Para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, estudos caracterizando de forma detalhada algumas nucleases extracelulares foram realizados com genes clonados a partir *S. marcescens*, *V. cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Mesorhizobium loti*, *Prevotella bryantii* e *S. aureus*, (Kovacevik *et al.*, 1985; Ball *et al.*, 1987; Focareta & Manning, 1987; Wu *et al.*, 2001; Pimkin *et al.*, 2006; Accetto & Avgustin, 2007).

Em *S. marcescens*, uma nuclease extracelular com aproximadamente 26 KDa e codificada pelo gene *nucA*, foi descrita (Benedik & Strych, 1998). Esta enzima foi caracterizada como uma hidrolase açúcar não-específico capaz de clivar, tanto DNA quanto RNA, sob a forma de fita simples ou dupla. Além disso, esta nuclease requer cátions divalentes, preferencialmente, Mg^{2+} , é ativa em pH variando entre 6 e 10 (ótimo 8 a 8,5) e apresenta temperatura ótima de ação entre 35 e 44°C (Eaves & Jeffries, 1963; Nestle & Roberts, 1969). Essa nuclease extracelular apresenta um elevado grau de homologia com algumas nucleases de eucariotos (Friedhoff *et al.*, 1994).

Já em *V. cholerae*, duas nucleases extracelulares foram evidenciadas, sendo denominadas Xds e Dns (Focareta & Manning, 1991). A nuclease extracelular Xds é decodificada pelo gene *xds*, o qual produz um único polipeptídio com tamanho molecular de 100 KDa (Pukatzki *et al.*, 2006), enquanto que a nuclease extracelular Dns apresenta 24 KDa (Focareta & Manning, 1991). Altermark *et al.* (2006a) cristalizaram a

Dns e avaliaram a sua estrutura designando-a como *V. cholerae* EndA. A comparação de sua estrutura cristalizada permitiu evidenciar alta homologia com uma nuclease periplasmática denominada endonuclease I (Vvn) de *V. vulnificus* (Li *et al.*, 2003).

A inativação de ambos os genes *xds* e *dns* em *Vibrio* spp. , mostrou um aumento na taxa de transformação nestas bactérias, tornando evidente o seu papel na proteção quanto à entrada de material genético exógeno (Newland *et al.*, 1985; Focareta & Manning, 1991). Em *V. vulnificus* uma nuclease com aproximadamente 25 KDa foi clonada e caracterizada. Esta nuclease é codificada pelo gene *vvn*, o qual apresenta uma ORF de 696 pb que codifica 232 aminoácidos, incluindo uma sequência de 18 aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal. Esta enzima apresenta capacidade de degradar DNA e RNA e é secretada para o espaço periplasmático tanto em *V. vulnificus* quanto em *E. coli* recombinante. Como mencionado anteriormente, esta enzima apresenta homologia com Dns de *V. cholerae* e da mesma forma, desempenha um papel importante no controle da entrada de DNA exógeno nesta bactéria (Wu *et al.* 2001).

Uma nuclease extracelular denominada M1 de *Mesorhizobium loti* foi clonada e caracterizada. Esta nuclease apresenta homologia com a nuclease S1 de *Aspergillus oryzae* e demonstrou variadas atividades sobre RNA de fita simples, DNA de fita simples e DNA de fita dupla. Sua atividade sobre DNA fita simples foi 25 vezes maior em comparação a atividade sobre DNA fita dupla, que por sua vez, foi três vezes maior em comparação a atividade sobre RNA fita simples. A caracterização bioquímica desta nuclease suporta seu alinhamento de sequência, o qual revelou um mínimo de 21 resíduos de aminoácidos que são necessariamente conservados para sua classificação como uma hidrolase com ação sobre pontes de ésteres (Pimkin *et al.*, 2006).

Em *Prevotella bryantii* uma nuclease extracelular com aproximadamente 36 KDa foi clonada. Esta nuclease foi designada como nucB e apresenta atividade sobre

DNA e RNA sendo caracterizada como uma endonuclease não-específica. Esta enzima requer $MgCl_2$, $CoCl_2$ ou $MnCl_2$ para sua atividade sobre DNA e é inibida por EDTA. No entanto, sua atividade sobre RNA não requer $MgCl_2$ e não é significativamente inibida por EDTA (Accetto & Avgustin, 2007).

Nucleases extracelulares de *S. aureus* são enzimas muito bem estudadas tanto física quanto bioquimicamente (Anfinsen *et al.*, 1971). Essa bactéria secreta duas formas de nucleases, a nuclease A, forma predominante, é constituída por 149 aminoácidos e apresenta 16,8 KDa, enquanto que a segunda forma da enzima, designada como nuclease B, apresenta um tamanho molecular de 18,8 KDa em virtude de um prolongamento constituído de 19 aminoácidos na porção amino-terminal da enzima nuclease A, indicando ser um possível precursor da mesma (Taniuchi *et al.*, 1967; Davis *et al.*, 1977). Embora a nuclease de *S. aureus* tenha sido clonada em *E. coli*, a produção desta enzima neste hospedeiro foi baixa e aparentemente não foi processada com eficiência. No entanto, quando clonada e expressa em *B. subtilis*, 80% do produto do gene ativo foi secretado para o meio extracelular (Kovacevik *et al.*, 1985).

Em *Aeromonas*, algumas nucleases, foram clonadas e expressas, no entanto, estudos relacionados à caracterização detalhada das nucleases extracelulares produzidas por esta bactéria ainda são escassos.

3.5.2 Nucleases de *Aeromonas* spp.

As aeromonas são conhecidas pela sua capacidade de produção de uma gama de enzimas e toxinas extracelulares, envolvidas na nutrição destas bactérias, e em alguns casos, associadas à patogenicidade de algumas espécies. Entre as enzimas extracelulares de *Aeromonas* destacam-se β -lactamases, lipases, hemolisinas, proteases, quitinases, amilases e nucleases (Pemberton *et al.*, 1997). Além do seu potencial papel nutricional, as nucleases extracelulares foram apontadas como fatores de virulência (Focareta &

Manning, 1987; Hsia *et al.*, 2005).

Em *Aeromonas* spp. duas nucleases (DNases) extracelulares foram identificadas sendo elas designadas como dns e nucH. A primeira corresponde a uma DNase periplasmática de baixo peso molecular (aprox. 25 KDa) denominada DnsH ou Dns, com elevada similaridade de sequência de aminoácidos com a nuclease Vvn de *V. vulnificus* (Wu *et al.*, 2001) e as nucleases de *S. marcescens*, *E. chrysanthemi* e *E. coli* (Dodd & Pemberton, 1999).

Ao longo dos últimos anos o número de genomas completamente sequenciados em *Aeromonas* spp. tem aumentado. O gene que codifica a enzima dns localiza-se na posição 3534995-3535747 do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 (Seshadri *et al.*, 2006), 3828519-3829270 do genoma de *A. hydrophila* pc104A (Pridgeon *et al.*, 2014), 3828560-3829311 do genoma de *A. hydrophila* AL09-71 (Pridgeon *et al.*, 2014a), 761853-762502 do genoma de *A. hydrophila* YL17 (Lim & Chan, 2014), 1218784-1219546 do genoma de *A. hydrophila* 4AK4 (Gao *et al.*, 2013), 3829137-3829888 do genoma de *A. hydrophila* ML09-119 (Tekedar *et al.*, 2013), 3419978-3420635 do genoma de *A. veronii* B565 (Li *et al.*, 2011), 805517-806273 do genoma de *A. media* WS (Chai *et al.*, 2012), e 1239554-1240243, do genoma de *A. salmonicida* A449 (Reith *et al.*, 2008).

O gene *dns* de *A. hydrophila* CHC-1 foi clonado e expresso em *E. coli* inicialmente por Chang *et al.* (1992). Em um trabalho posterior, Dodd & Pemberton (1999) clonaram novamente o gene *dns*, no entanto, de outra linhagem de *A. hydrophila* designada como JMP636. No trabalho realizado por Dodd & Pemberton (1999), foi possível identificar uma ORF de 711 nucleotídeos e uma proteína predita com 237 aminoácidos com massa molecular calculada de 27,4 KDa. A análise comparativa das duas enzimas clonadas permitiu identificar a presença de sete aminoácidos a mais na

dns de *A. hydrophila* JMP636 em comparação a dns clonada a partir de *A. hydrophila* CHC-1. Além disso, a análise da predição de peptídeo sinal indicou a presença de 27 aminoácidos na dns de *A. hydrophila* JMP636, o qual foi superior a aquele encontrado em *A. hydrophila* CHC-1. Por outro lado, a análise de predição da proteína madura, indicou um tamanho idêntico (210 aminoácidos), entre as duas linhagens avaliadas, com uma similaridade de 92% e uma identidade de 89%.

Apesar disso uma divergência é observada entre os dois trabalhos. Segundo Dodd & Pemberton (1999), a dns de *A. hydrophila* JMP636 é encontrada no periplasma ou associada à membrana, mas não é secretada por *E. coli*, enquanto que a dns clonada por Chang *et al.* (1992) a partir da linhagem de *A. hydrophila* CHC-1 foi secretada de forma eficiente para o meio extracelular por *E. coli*. Esta divergência foi atribuída a uma possível lise celular, reflexo das distintas linhagens de *E. coli* utilizadas nos dois trabalhos. A atividade enzimática da dns de *A. hydrophila* JMP636 foi descrita como correspondendo a uma endonuclease capaz de atuar sobre DNA plasmidial, DNA fita simples e RNA (Dodd & Pemberton, 1999).

A segunda DNase extracelular descrita em aeromonas consiste em uma enzima de aproximadamente 114 KDa, denominada nucH (Dodd & Pemberton, 1996). O gene que codifica esta enzima apresenta aproximadamente 3.2 Kb, e está localizado nas posições 2398305-2401523 do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 (Seshadri *et al.*, 2006), 2695465-2698683 do genoma de *A. hydrophila* pc104A (Pridgeon *et al.*, 2014), 2695473-2698691 do genoma de *A. hydrophila* AL09-71 (Pridgeon *et al.*, 2014a), 2695824-2699042 do genoma de *A. hydrophila* ML09-119 (Tekedar *et al.*, 2013), 1759079-1762297 do genoma de *A. hydrophila* YL17 (Lim & Chan, 2014), 2101629-2104847 do genoma de *A. hydrophila* 4AK4 (Gao *et al.*, 2013), 3419978-3420635 do genoma de *A. veronii* B565 (Li *et al.*, 2011), 1712022-1715237 do genoma de *A. media*

WS (Chai *et al.*, 2012) e 2340858-2337640 do genoma de *A. salmonicida* A449 (Reith *et al.*, 2008).

A avaliação da sequência de nucleotídeos do gene *nucH* e de sua sequência proteica predita em *A. hydrophila* JMP636, indicou que esta enzima é capaz de ser processada para o periplasma. Além disso, estudos realizados empregando a proteína produzida pelo gene *nucH* de *A. hydrophila* JMP636 indicaram tratar-se de uma enzima sensível ao tratamento térmico, resistente a 2-mercaptoetanol, e com capacidade de degradar DNA de fita simples, DNA de fita dupla e RNA (Dodd & Pemberton, 1996). A análise de bioinformática empregando BLASTp indicou a ausência de homólogos previamente descritos (Dodd & Pemberton, 1996). Entretanto, uma nuclease com 100 KDa (não sequenciada) foi descrita por Newland *et al.* (1985) em *V. cholerae*.

A avaliação de perfis eletroforéticos obtidos a partir do extrato extracelular de *A. hydrophila* JMP636 e em uma linhagem *nucH*-deficiente designada como JMP5513, indicaram a presença de outras duas áreas com atividades nucleásica. Uma destas áreas corresponde em tamanho molecular a nuclease dns já descrita para *A. hydrophila*. A outra área corresponde a uma banda com peso molecular de aproximadamente 80 KDa, para a qual nenhum estudo foi realizado no intuito de caracterizá-la (Dodd & Pemberton, 1996). O gene que potencialmente codifica esta nuclease apresenta aproximadamente 2,1Kb, e está localizado na posição 3873435-3875579 de *A. hydrophila* ATCC7966 (Seshadri *et al.*, 2006) e 899350-897218 de *A. salmonicida* (Reigh *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar que o estudo de nucleases em *Aeromonas* spp. se limita apenas a três linhagens de *A. hydrophila* e uma de *A. salmonicida*, não existindo até o presente um levantamento amplo destas enzimas no gênero.

3.6 Predição de estruturas proteicas empregando ferramentas de bioinformática

Até o final de 2015, aproximadamente seis milhões de sequências de proteínas foram depositadas em bancos de dados públicos e seu número vem crescendo rapidamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). Dentre este número de sequências depositadas, apenas cerca de 50.000 proteínas apresentam suas estruturas experimentalmente determinadas. Esta diferença entre o número de sequências depositadas, e o número de estruturas determinadas tem levado ao desenvolvimento de métodos computacionais com o objetivo de prever a estrutura de uma proteína com base em sua sequência de aminoácidos (Kelley & Sternberg, 2009).

Métodos computacionais fundamentados em simulações do processo de *folding* utilizando apenas sequências de aminoácidos como *input*, têm demonstrado alguns progressos ao longo do tempo. No entanto, estas ferramentas ainda mostram-se limitadas quando são aplicadas em sequências com tamanhos superiores a 100 aminoácidos (Kopp *et al.*, 2007).

Dentre os principais bancos de dados com depósitos de sequências de aminoácidos derivados de traduções de sequências nucleotídicas estão o GenPept (Benson *et al.*, 2009), RefSeq (Pruitt *et al.*, 2007), o PIR (*Protein Information Resource*) (Wu *et al.*, 2002) e o UniProtKB (*UniProt Knowledgebase*) (Baïoroch *et al.*, 2005). Estes bancos de dados desempenham um papel fundamental na busca por informações e análises comparativas entre as proteínas de interesse.

Outro importante banco de dados é o PDB (*Protein Data Bank*), o qual consiste em um repositório universal de estruturas tridimensionais de macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos) baseado em experimentos químicos, tipicamente realizados empregando cristalografia por raios-X, espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR), microscopia crioeletrônica e modelagens teóricas (Berman *et al.*, 2000).

Um grande número de ferramentas computacionais auxiliares é empregado na avaliação, extração e refino de informações dos diferentes bancos de dados disponíveis. O conjunto dos principais programas e ferramentas utilizados em diferentes processos de avaliações em bioinformática foi descritos por Pavlopoulou & Michalopoulos, (2011). A comparação de estruturas proteicas primárias, secundárias ou terciárias fornece informações relevantes a respeito das possíveis funções desempenhadas por estas macromoléculas.

Além disso, a aplicação prática de predições na estrutura tridimensional de proteínas pode fornecer informações que levam ao desenvolvimento de hipóteses acerca de funções de proteínas hipotéticas (Watson *et al.*, 2005), aprimoram a fase final de sinais em processos cristalográficos (Qian *et al.*, 2007), selecionam sítios para mutagênese (Rava & Hussain, 2007), e racionalizam o desenvolvimento de drogas que atuem em regiões específicas (Park *et al.*, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas utilizadas

As linhagens de *Aeromonas* spp. utilizadas neste trabalho encontram-se relacionadas na Tabela 4. Estas linhagens fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Tabela 4. Descrição das linhagens de *Aeromonas* spp.: denominação, espécie e origem.

Código	Espécie	Origem	Código	Espécie	Origem
IBAer001	<i>A. sobria</i>	ATCC 43979*-peixe	IBAer110	<i>A. sobria</i>	Diarréia Humana
IBAer002	<i>A. hydrophila</i>	CECT 839*-leite	IBAer111	<i>A. hydrophila</i>	Diarréia Humana
IBAer003	<i>A. ichthiosmia</i>	ATCC 49904*-água	IBAer112	<i>A. hydrophila</i>	Diarréia Humana
IBAer004	<i>A. media</i>	ATCC 33907*-efluente	IBAer113	<i>A. hydrophila</i>	Diarréia Humana
IBAer005	<i>A. salmonicida</i>	ATCC 33658*-peixe	IBAer114	<i>A. hydrophila</i>	Fezes Humanas
IBAer006	<i>A. caviae</i>	ATCC 14486*-desc.	IBAer115	<i>A. hydrophila</i>	Fezes Humanas
IBAer007	<i>A. hydrophila</i>	NCIB 9233*-leite	IBAer116	<i>A. hydrophila</i>	Fezes Humanas
IBAer008	<i>A. caviae</i>	ATCC 15468*-roedor	IBAer117	<i>A. hydrophila</i>	Fezes Humanas
IBAer009	<i>A. caviae</i>	IOC-fezes humanas	IBAer119	<i>A. hydrophila</i>	Fezes Humanas
IBAer010	<i>A. sobria</i>	IOC-fezes humanas	IBAer120	<i>A. hydrophila</i>	Fezes Humanas
IBAer011	<i>A. trota</i>	ATCC 49657*-fezes hum.	IBAer141	<i>A. caviae</i>	Pele Suína
IBAer012	<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966*-leite	IBAer142	<i>A. caviae</i>	Pele Suína
IBAer013	<i>A. hydrophila</i>	CCT 191*-água	IBAer144	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer014	<i>A. encheleia</i>	CECT 4341*-peixe	IBAer145	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer015	<i>A. veronii</i> var. <i>sobria</i>	ATCC 35624*-escarro	IBAer146	<i>A. caviae</i>	Pele Suína
IBAer016	<i>A. eucrenophila</i>	ATCC 43979*-peixe	IBAer150	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer017	<i>A. allosaccharophila</i>	ATCC 4199*-peixe	IBAer151	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer101	<i>Aeromonas</i> spp.	Diarréia Humana	IBAer153	<i>A. caviae</i>	Pele Suína
IBAer102	<i>A. caviae</i>	Diarréia Humana	IBAer155	<i>A. caviae</i>	Pele Suína
IBAer103	<i>A. hydrophila</i>	Diarréia Humana	IBAer157	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer105	<i>A. caviae</i>	Diarréia Humana	IBAer158	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer106	<i>A. hydrophila</i>	Diarréia Humana	IBAer159	<i>A. caviae</i>	Pele Suína
IBAer107	<i>A. caviae</i>	Diarréia Humana	IBAer165	<i>A. trota</i>	Pele Suína
IBAer109	<i>A. hydrophila</i>	Diarréia Humana	IBAer167	<i>A. hydrophila</i>	Pele Suína

ATCC: American Type Culture Collection; NCIB: National Collection of Industrial Bacteria; IOC: Instituto Oswaldo Cruz, sem código de origem; CECT: Collécion Española de Cultivos Tipo; CCT: Coleção de Culturas Tropical. * Cedida por Dr. Naharro - Universidad de León, Espanha.

Para procedimentos envolvendo a clonagem de genes, a linhagem de *E. coli* DH5 α (θ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk-, mk+), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF)U169), foi utilizada.

4.2 Condições de cultivo

As amostras de *Aeromonas* utilizadas neste trabalho foram mantidas em meio de Luria Bertani (LB) semi-sólido (10 g.L⁻¹ de triptona; 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 5 g.L⁻¹ de NaCl; 10 g.L⁻¹ de ágar; pH 7.2), a temperatura ambiente. Foram feitos repiques destas amostras em intervalos de 30 dias, para a renovação deste banco.

As linhagens e os isolados utilizados para a execução dos testes foram estriados e mantidos em placas de Petri, em meio de cultura LB sólido. A cada 15 dias, as amostras foram repicadas. Além do meio LB, o meio mínimo M9 (1 g.L⁻¹ de NH₄Cl; 5,9 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄ 2H₂O; 3 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 5 g.L⁻¹ de NaCl; 4,9x10⁻³ g.L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O; 2x10⁻² g.L⁻¹ de glicose; 1,47x10⁻⁴ g.L⁻¹ de CaCl₂ 2H₂O) modificado de acordo com o teste realizado, foi utilizado no crescimento bacteriano para alguns experimentos.

4.3 Obtenção dos extratos brutos de proteínas extracelulares

Para a obtenção dos extratos extracelulares brutos, as bactérias foram cultivadas em meio LB ou meio M9 modificado, a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm, por 24 h. Esta cultura inicial foi utilizada como pré-inóculo para uma cultura de 5 mL de meio LB ou M9 modificado. A nova cultura foi incubada por 20 h a 37°C, sob agitação continua de 180 rpm. Após este período, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 13000 rpm por 3 min., e os sobrenadantes (extratos extracelulares) foram filtrados utilizando filtros estéreis de 0,2 µm. Aliquotas com volumes de 1 mL foram preservadas e mantidas a -20°C até o momento das análises.

4.4 Obtenção de extratos de proteínas periplasmáticas

A obtenção dos extratos periplasmáticos seguiu o método proposto por Ames *et al.* (1984). Brevemente, as bactérias foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) a 37°C sob agitação constante de 180 rpm por 24 h. Esta cultura inicial foi utilizada como pré-

inóculo para uma cultura de 5 mL em meio LB. A nova cultura foi incubada por 20 h a 37°C, sob agitação contínua de 180 rpm. Após, 1 mL da cultura foi retirado e transferido para um novo tubo onde as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 3 minutos, e os sobrenadantes desprezados. As células foram lavadas três vezes com solução salina (0,9%), ressuspensas cuidadosamente em 20 µL de clorofórmio e mantidas a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) e as células foram centrifugadas a 6000 rpm. A fração aquosa contendo as proteínas periplasmáticas foi retirada cuidadosamente com auxílio de micropipetador. Todas as alíquotas foram mantidas em freezer a -20°C, até o momento das análises.

4.5 Avaliação quantitativa da atividade DNásica extracelular

A atividade DNásica dos extratos brutos foi quantificada empregando DNA de esperma de salmão como substrato. Brevemente, alíquotas de 20 µL de extrato bruto correspondente a cada amostra foi adicionado a 480 µL de solução contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 200 µg de DNA de esperma de salmão (Sigma) e incubadas a 37°C por 15 min. Após este período, adicionou-se 500 µL de ácido perclórico 15% (PCA) e então as amostras foram mantidas a 0°C por 15 min., para paralisar a reação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min., e retirando-se 600 µL do sobrenadante. A absorbância (260 nm) foi determinada em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia). Para fins de cálculo da atividade DNásica foi utilizada a seguinte fórmula, adaptada do Worthington Enzyme Manual, (Worthington, K. & Worthington, V., 2011):

$$\text{U/mL/min} = \frac{A_{260\text{nm}}(\text{A}) - A_{260\text{nm}}(\text{B}) \times 2500}{15\text{min}}$$

Onde:

$A_{260\text{nm}}$ (A): corresponde à absorbância da amostra com extrato após a incubação.

$A_{260\text{nm}}$ (B): corresponde à absorbância da amostra com extrato não incubada (branco).

O valor de 2500 consiste em um fator derivado da divisão do volume de reação (1 mL) pelo valor da absorbância ($A_{260\text{nm}}$) de 1 μg de DNA de esperma de salmão, o qual corresponde a 0,020, e dividido pelo volume de extrato utilizado (0,02 mL). Por definição 1 Unidade corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 μg de nucleotídeos solúveis ($A_{260\text{nm}}=0,020$) por mL, por min. a 37°C, em pH 8,0.

4.6 Avaliação quantitativa da atividade DNásica extracelular termooestável

A atividade DNásica termooestável dos extratos brutos foi quantificada empregando DNA de esperma de salmão como substrato. Para o tratamento térmico, as amostras foram incubadas a 100°C por 10 min. em banho seco. Imediatamente após o período de incubação, as amostras foram submetidas a análise conforme descrito no item 4.5.

4.7 Avaliação semiquantitativa da atividade DNásica

As bactérias foram cultivadas em meio LB, a 37°C, até atingirem a fase estacionária de crescimento. As amostras bacterianas foram inoculadas mediante método de gotas (2 μL) em placas de Petri contendo DNase Test Agar (MERCK), acrescido de 0,01 g/L de azul de toluidina e incubadas por 24 h ou 48 h a 37°C. A atividade nucleásica foi evidenciada pela presença de halos com coloração metacromática variando de rosa a vermelha em torno das colônias, proveniente da liberação de nucleotídeos e consequente despolarização do corante em relação ao DNA intacto. A ausência de atividade nucleásica foi indicada quando não ocorreu alteração na coloração do meio. A atividade nucleásica foi avaliada e mensurada mediante

observação direta do halo de degradação gerado pela bactéria. As colônias envolvidas por um halo com coloração metacromática, que evidenciaram atividade enzimática sobre o meio, foram avaliadas pela fórmula [diâmetro do halo/diâmetro da colônia], sendo classificadas como: sem atividade nucleásica (0); moderada atividade nucleásica (1 a 2) e elevada atividade nucleásica (>2). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8 Avaliação dos perfis de nucleases extracelulares e cálculo da atividade DNásica com base na área de degradação

O perfil de DNases presentes nos extratos extracelulares foi avaliado através de eletroforese em géis de poliacrilamida com gradiente de concentração de 8-15% e copolimerizados com DNA de esperma de salmão a uma concentração final de 50 µg/mL.

A eletroforese foi realizada em condições não redutoras (ausência de fervura e adição de β -mercaptoetanol), empregando o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970). Em 10 µL de extrato bruto, foram acrescidos 15 µL de água e 25 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,4 mM, pH 6,8; SDS 2,5%, glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%), sendo depositados 25 µL no gel. Todas as eletroforeses foram realizadas em sistema vertical Mini-Protean (Bio-Rad), a 4°C com voltagem constante de 80V até o azul de bromofenol atingir o gel de separação e 120V até o final do gel. Após a eletroforese os géis foram submetidos a duas lavagens de 1h cada com Triton-X-100 2,5%, para a retirada do SDS residual. Em seguida, os géis foram incubados a 37°C por 12h em solução tampão contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl e 5 mM de MgCl₂. Para a coloração foi empregado brometo de etídio a uma concentração de 2,5 µg/mL. Os géis foram submetidos à avaliação em transluminador sob exposição de luz ultravioleta, e as DNases foram visualizadas como bandas de contraste negativo no gel. Para a determinação do tamanho molecular de cada banda com atividade

DNásica o padrão de peso molecular *Precision Plus Protein™ Prestained Dual Color* (Bio-Rad) foi utilizado. Além disso, a massa molecular também foi estimada mediante a comparação da distância relativa calculada com base em uma banda pré-estabelecida no gel. As áreas das bandas individuais foram determinadas, após digitalização dos zimogramas, através do programa CPATLAS 2.0 e a área encontrada foi expressa em pixels. Todos os géis foram realizados em duplicata.

4.9 Avaliação da estabilidade térmica de DNases extracelulares empregando zimogramas

Para a avaliação da estabilidade térmica empregando zimogramas, uma linhagem de *A. hydrophila* IBAer012 (ATCC7966) e três isolados correspondendo a *A. sobria* IBAer010 (IOC), e duas *A. hydrophila* IBAer112 e 119 foram selecionados com base em seu perfil de DNases. Para os testes, os extratos extracelulares obtidos conforme o item 4.3, foram incubados a uma temperatura de 100°C em banho seco em tempos de 0 a 50 min. e avaliados com intervalos de 5 min. Após a incubação, as amostras foram imediatamente aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com gradiente de concentração de 8-15%, na presença de DNA de espermatozoides de salmão a uma concentração final de 50 µg/mL, submetidas à eletroforese e avaliadas conforme descrito no item 4.8.

4.10 Curva de crescimento e determinação da atividade DNásica extracelular quantitativa de *A. hydrophila* IBAer119

Para avaliar a atividade DNásica ao longo do período de multiplicação, o isolado de *A. hydrophila* IBAer119 foi crescido em meio LB, a 37°C sob agitação constante de 180 rpm por 24 h. Esta cultura inicial foi utilizada como pré-inóculo e o seu crescimento foi monitorado em intervalos de duas horas (0-24h) e após, em intervalos de 12 h até

completar 48 h de incubação, em espectrofotômetro (Biochrom) a $A_{600\text{nm}}$.

A cada avaliação, alíquotas de 1 mL do extrato extracelular foram retiradas e submetidos aos procedimentos de acordo com o item 4.3. A determinação da atividade DNásica, foi realizada conforme estabelecido no item 4.5. As avaliações foram realizadas em triplicata.

4.11 Avaliação do efeito de proteases sobre a atividade DNásica extracelular de *A. hydrophila* IBAer119

Com o objetivo de avaliar um possível efeito de proteases sobre a atividade DNásica extracelular, extratos extracelulares provenientes de *A. hydrophila* IBAer119, incubada em meio LB a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm, foram coletados nos tempos 0, 12, 20, 24, 36 e 48 h. A atividade DNásica foi avaliada conforme descrito no item 4.4. Já a atividade proteolítica quantitativa dos extratos brutos bacterianos foi avaliada utilizando azocaseína como substrato de acordo com Bonato *et al* (1982). Uma unidade corresponde a um incremento de 0,1U de D.O.₄₂₀ por mL em 60 min. a 37°C (Belas *et al.*, 1995).

Além disso, alíquotas dos extratos obtidos com 20h e 48h, foram misturadas nas proporções de 1:0; 1:4; 1:2 e 1:1 (20 h:48 h). Em seguida, a mistura foi incubada a 37°C por 15 min. e após, a atividade DNásica extracelular foi avaliada conforme descrito no item 4.5.

4.12 Curva de crescimento e determinação da atividade DNásica extracelular quantitativa empregando DNA como fonte de nitrogênio e fósforo em *A. hydrophila* IBAer119

Para a realização da curva de crescimento e posterior determinação da atividade DNásica empregando DNA como fonte de nitrogênio e fósforo, o isolado de *A.*

hydrophila IBAer119 foi inicialmente crescido em meio LB, a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm por 24 h. Após este período, a cultura bacteriana foi lavada três vezes com solução salina (0,9%) e mantidas nesta solução por 1 h para que as células esgotassem o suplemento nutricional proveniente do meio LB. Posteriormente, a cultura foi incubada a uma $D.O_{600nm} = 0,25$ em 100 mL de meio (1) M9 normal acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão; (2) M9 sem fonte de nitrogênio, acrescido de 33 mM de Tris-HCl pH 6,8 e 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão; (3) M9 sem fonte de fósforo, acrescido de 33 mM de Tris-HCl pH 6,8 e 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão; (4) M9 normal sem adição de DNA de esperma de salmão; (5) M9 acrescido de 33 mM de Tris-HCl pH 6,8, sem adição de fonte de nitrogênio e sem adição de DNA de esperma de salmão; e por fim (6) M9 acrescido de 33 mM de Tris-HCl pH 6,8, sem adição de fonte de fósforo e sem adição de DNA de esperma de salmão. Estas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 180 rpm por 24 h. As amostras foram monitoradas quanto ao seu crescimento (A_{600nm}) e alíquotas de 2mL foram retiradas nos tempos 1, 3, 6, 12 e 24h, centrifugadas a 13000 rpm por 3 minutos, e os sobrenadantes armazenados a -20°C até o momento das análises.

A quantificação da atividade DNásica seguiu o procedimento descrito no item 4.5. O *pellet* de células proveniente da centrifugação foi lavado três vezes com solução salina (0,9%) e mantido a -80°C para posterior extração de RNA e avaliação da expressão gênica utilizando *Real Time PCR* (qRT-PCR).

4.13 Amplificação e clonagem dos códons dos genes *dns* e *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119

4.13.1 Amplificação dos códons dos genes *dns* e *aha3441*

Com o intuito de clonar os códons dos genes correspondentes as DNases *dns* e *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119, *primers* foram projetados a partir das sequências de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449 depositadas no NCBI, com auxílio dos programas BioEdit 7.0 e FastPCR. Os *primers* projetados correspondem às sequências apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. *Primers*, sequências, tamanho do fragmento amplificado e aplicação.

<i>Primer</i>	Sequência (5'>3') ^a	Fragmento	Aplicação
dnsclonF dnsclonR	GCG <u>AAGCTT</u> ATGTTTCGTCCTGTYTYC GCG <u>CTCGAG</u> TTTCATAGATACGTGGAATGCG	771pb	Clonagem dos códons do gene <i>dns</i> sem seu promotor e com seu terminador.
aha3441clonF aha3441clonR	GCG <u>TCGCGA</u> AATGAAAGGAACACGTRCCCT GCG <u>AGATCT</u> GCGGTGGCCTTTTGTGTTTG	2245pb	Clonagem dos códons do gene <i>aha3441</i> sem seu promotor e com seu terminador

As regiões destacadas nos *primer* correspondem a sítios de clivagem desenhados para eventuais sub-clonagens. Sítio em dnsclonF para a enzima de restrição *HindIII*, e em dnsclonR para a enzima de restrição *XhoI*. Sítio em aha3441clonF para a enzima de restrição *NruI* e em aha3441clonR para a enzima de restrição *BglII*. ^aY=C/T e R=A/G.

Para a amplificação dos códons correspondentes aos genes *dns* e *aha3441*, *A. hydrophila* IBAer119 foi crescida a 37°C/18 h em 5 mL de meio LB. Após este período, a cultura foi centrifugada a 13000 rpm por 5 min. e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi lavado três vezes com solução salina (0,9%), e então submetidas à extração de DNA genômico empregando o Kit de extração *Wizard® Plus Midprep DNA Purification System* (Promega) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após a extração o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliação de sua integridade e em seguida foi quantificado em espectrofotômetro (Biochrom) a A_{260nm} e A_{280nm}.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25 µL contendo: 12,85 µL de água Milli-Q autoclavada, 2,5 µL de *Buffer* 10x (Tris-HCl pH 8,3), 2 mM de MgSO₄, 0,8 mM de solução dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 µM de cada *primer*, e 0,75 U de TaqDNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen).

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems®), programado para 5 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para a desnaturação das fitas do DNA, 30 segundos à temperatura de 56 °C para anelamento de cada um dos conjuntos de *primers*, e um minuto e 30 segundos para (*dns*) e dois minutos para (*aha3441*) a 72°C correspondendo ao período estabelecido para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 35 ciclos foi feita uma extensão suplementar por 5 min. a 72°C e as amostras mantidas por 5 min. a 4°C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a -20°C.

4.13.2 Separação eletroforética e visualização dos fragmentos amplificados

Para a visualização e avaliação dos fragmentos correspondente aos genes *dns* e *aha3441*, os produtos de amplificação foram submetido a eletroforese (3V/cm), em gel horizontal de agarose 1,5% empregando tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM de ácido bórico e 8 mM de EDTA), acrescidos de solução de brometo de etídio (30µg/100 mL). Como tampão de corrida utilizou-se também o TBE 1X. Os produtos amplificados foram visualizados sob transluminador U.V. Um padrão de peso molecular foi incluído nos géis para a determinação do peso molecular correto das bandas obtidas.

4.13.3 Ligação e clonagem dos genes *dns* e *aha3441*

Para a clonagem dos códons dos genes *dns* e *aha3441* correspondentes a duas DNases de *A. hydrophila* IBAer119, foi utilizado o kit TOPO® TA Cloning

(Invitrogen[®]), contendo o vetor pCR[™]2.1 TOPO[®], o qual apresenta 3931pb.

O procedimento de clonagem ocorreu da seguinte maneira: em um tubo tipo *Eppendorf* foi adicionado 1 µL do tampão de reação, 3 µL do produto de PCR, 1 µL de água livre de nucleases e 1 µL do vetor pCR[™]2.1 TOPO[®]. Esta mistura foi mantida a temperatura ambiente (25±2°C) por 5 min., e posteriormente utilizada para os procedimentos de transformação.

4.13.4 Obtenção de células competentes e transformação

Para a obtenção de células competentes foi utilizado o método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Brevemente, *E. coli* DH5α foi cultivada sob agitação constante em meio LB suplementado com 10 mM de MgSO₄ 7H₂O e 0,2% de glicose até atingirem uma densidade ótica (D.O._{600nm}) entre 0,45 e 0,5. Posteriormente as células foram mantidas em gelo por 10 min. e então centrifugadas a 13000 rpm por 10 min. a 4°C. Em seguida as células foram cuidadosamente ressuspensas em 500 µL meio LB contendo 10 mM de MgSO₄ 7H₂O e 0,2% de glicose, resfriado, e acrescidas de 2,5 mL de uma solução formada por 36% de glicerol, 12% de PEG e 12 mM de MgSO₄ 7H₂O. As células competentes assim obtidas foram aliquoteadas em volumes de 100 µL e estocadas a -80°C até o momento de sua utilização.

Para transformação as células competentes foram cuidadosamente descongeladas e mantidas em gelo. Imediatamente após o descongelamento foram adicionados 6 µL da mistura de ligação obtida de acordo com o item 4.13.3, permanecendo por 20 min. a 4°C. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 60 segundos e incubadas em banho de gelo por 2 min. As células foram diluídas 1/10 e incubadas em meio LB por 1 h a 37°C, para permitir a expressão do gene de resistência a canamicina. Amostras de 100 µL foram plaqueadas em meio LB contendo 30 µg/mL

de canamicina e incubadas por 18 h a 37°C. Os transformantes foram re-isolados e mantidos a 4°C sob pressão de seleção utilizando canamicina. Após o isolamento, os clones obtidos foram plaqueados em meio DNase Test Agar (MERCK), acrescido de 0,01 g/L de Azul de Toluidina e 30 µg/mL de canamicina, e a confirmação da clonagem observada mediante formação de halo metacromático em volta das colônias. A partir desta confirmação, dois clones foram selecionados sendo estes designados como IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8. Todos os testes de caracterização enzimática foram realizados empregando estes recombinantes.

4.13.5 Sequenciamento dos genes *dns* e *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119.

Com intuito de avaliar as sequências nucleotídicas dos genes *dns* e *aha3441* provenientes do isolado de *A. hydrophila* IBAer119, e dos clones IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8 as bactérias foram cultivadas em meio LB a 37°C sob agitação constante de 180 rpm por 24h. Quando necessário 30 µg/mL de Canamicina foi adicionada ao meio. Após este período o DNA genômico de *A. hydrophila* IBAer119 foi extraído empregando o kit de extração *Wizard® Plus Midprep DNA Purification System* (Promega). Para os clones IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8, o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel) conforme as recomendações do fabricante. Em seguida da extração do DNA genômico e do DNA plasmidial as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro a A_{260nm} e A_{280nm} , diluídas apropriadamente e submetidas a PCR para amplificação dos fragmentos de interesse. Os *primers* utilizados para as amplificações estão representados na Tabela 6. As reações, assim como, as condições para amplificações seguiram o mesmo procedimento descrito no item 4.13.1. Após as amplificações, as amostras foram submetidas à eletroforese e o tamanho dos amplicons confirmados conforme descrito no item 4.13.2.

Tabela 6. *Primers* utilizados para análise de sequenciamento dos genes *dns* e *aha3441*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'>3') ^a	Fragmento	Aplicação
dns-1F dns-1R	ATGTTTCGTCCCCTGYTYTC TTCATAGATACGTGGAATGCG	771pb	Amplificação dos códons do gene <i>dns</i> sem seu promotor e com seu terminador.
aha3441-1F aha3441-1R	ATGAAAGGAACACGTRCCCT GCATCCGCCTGATCCTTGCAC	1043pb	Amplificação dos códons da região inicial do gene <i>aha3441</i> sem seu promotor
aha3441-2F aha3441-2R	TCGGCAGCTTCAACGTGCTCAA GCGGTGGCCTTTTTGTTTTG	1290pb	Amplificação dos códons da região final do gene <i>aha3441</i> incluindo seu terminador

^aR=A/G.

Posteriormente à confirmação, as amostras contendo os amplicons foram quantificadas utilizando o padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, USA) e tratadas com 0,25 µL de *exonuclease I* (2.500U - Amersham Bioscience®, USA), 0,25 µL de *shrimp alkaline phosphatase* (5.000U - Amersham Bioscience®, USA), 0,5 µL de água ultra pura *DNase/RNase free* e 6 µL do produto de PCR. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 30 min., e em seguida a 80°C por 15 min., para a inativação enzimática. Após o tratamento, alíquotas individuais de 6 µL contendo de 50-100 ng do produto de PCR e 0,25 µM de *primer F (Forward)* ou de *primer R (Reverse)* foram submetidos ao sequenciamento utilizando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®), em sequenciador Applied Biosystems® modelo 3130XL. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS.

4.14 Avaliação do efeito de inibidores sobre a atividade das enzimas recombinantes

Dns e Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para estes experimentos foram utilizados os extratos extracelulares brutos dos clones IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8, crescidos em meio LB acrescido de 30

µg/mL de canamicina a 37°C por 20h. Para a avaliação do efeito inibitório sobre a atividade DNásica foram empregados os seguintes reagentes: EDTA, DTT, β-mercaptoetanol, citrato de sódio e fosfato de sódio a uma concentração final de 10 mM, e SDS a uma concentração de 1%. Para os testes, estes compostos foram misturados a 480 µL de solução contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 200 µg de DNA de esperma de salmão (Sigma) e 20 µL do extrato extracelular. Esta mistura foi pré-incubada a temperatura ambiente por 15 min., e em seguida a atividade DNásica foi avaliada conforme descrito no item 4.5. Os resultados foram expressos em percentual de inibição em comparação ao controle sem qualquer agente inibidor. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.15 Determinação da temperatura de ação das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Da mesma forma que anteriormente, para a determinação da temperatura de ação das enzimas recombinantes Dns e Aha3441, foram utilizados os extratos extracelulares brutos dos clones crescidos em meio LB acrescido de 30 µg/mL de canamicina a 37°C por 24 h (para clone IBAer119-dnsC5) e 18 h (para o clone IBAer119-ahaC8). As análises de atividade DNásica foram realizadas em temperaturas variando de 20 a 90°C. Com exceção da temperatura de incubação, a análise foi realizada conforme o item 4.5. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.16 Determinação do pH de ação das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para a avaliação do pH de ação das enzimas Dns e Aha3441, foram utilizados os extratos extracelulares brutos dos clones IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8 crescidos em meio LB a 37°C por 22 h e 18 h, respectivamente, e acrescido de 30 µg/mL de canamicina. Para estes testes os extratos extracelulares foram incubados em soluções

com pHs variando de 3 a 9, em dois diferentes tampões, a uma concentração final de 20 mM. Para pHs entre 3 e 6 utilizou-se tampão citrato, enquanto que, para pHs variando de 7 a 9 utilizou-se tampão Tris-HCl. A análise da atividade enzimática seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 4.5, exceto pela substituição dos 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, quando necessário, pelas soluções tampão correspondentes a cada pH testado. Todos os testes foram conduzidos em triplicata.

4.17 Avaliação do efeito de diferentes cofatores na atividade das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para determinar o efeito de diferentes cofatores na atividade das enzimas Dns e Aha3441, foram utilizados os extratos extracelulares brutos dos clones IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8, crescidos em meio LB a 37°C por 20-24 h, acrescido de 30 µg/mL de canamicina. Para este experimento os extratos extracelulares foram incubados na presença de MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, MnCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ e FeSO₄ a uma concentração final de 5 mM e posteriormente a atividade enzimática foi avaliada. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.18 Determinação da estabilidade térmica das enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para a determinação da estabilidade térmica das enzimas Dns e Aha3441, os extratos extracelulares brutos dos clones IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8 foram pré-incubados em temperaturas de 40, 60 e 90°C por tempos variando entre 5 e 60 minutos. Imediatamente após estes períodos, as atividades enzimáticas foram determinadas conforme descrito no item 4.5. Todos os testes foram conduzidos em triplicata.

4.19 Avaliação da atividade enzimática sobre DNA e RNA, do extrato contendo as enzimas recombinantes Dns e Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para determinar a especificidade por substratos, 1 µg de RNA de *Torula* (USB®) ou do plasmídeo pCAMBIA1303 linearizado, foram incubados com 5 µL de extrato extracelular contendo as enzimas clonadas Dns ou Aha3441. As reações foram realizadas em volume de 20 µL de tampão 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, e incubadas a 37°C por 1 h. Como controles positivos da reação o extrato bruto extracelular contendo as enzimas clonadas Dns ou Aha3441 foi substituído por 1 µL de RNase A (20 mg/mL) ou DNase I (2U/µL) incubadas sob as mesmas condições. Após o período de incubação a reação foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, mediante visualização em transluminador U.V.

4.20 Avaliação do efeito de DNA como fonte de nitrogênio e fósforo na expressão dos genes *dns*, *aha3441* e *nuc* em *A. hydrophila* IBAer119 através de *real time* PCR (RTq-PCR)

4.20.1 Extração de RNA total

Para a avaliação do efeito de DNA como fonte de nitrogênio e fósforo sobre a expressão das enzimas Dns, Aha3441 e Nuc, a bactéria *A. hydrophila* IBAer119 foi cultivada em meio mínimo M9, modificado, conforme descrito no item 4.12. O RNA total foi extraído de amostras retiradas após 1, 3, 6, e 12h de cultivo utilizando *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™). Brevemente, 2 mL da cultura foram centrifugados a 13000 rpm por 5 min., descartando o sobrenadante e preservando o *pellet* de células. Este *pellet* foi lavado três vezes com solução salina estéril e em seguida 1 mL de TRIzol® foi adicionado e o mesmo foi ressuspensionado vigorosamente. O homogeneizado foi então incubado por 5 min. a temperatura ambiente e após adicionou-se 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por inversão e incubados por 3 min. a

temperatura ambiente. Após este período as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 min. a 4°C. A fase aquosa foi retirada e a ela adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico gelado. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugadas por 10 min. a 4°C. O *pellet* obtido foi então lavado uma vez com 1 mL de etanol 75%, e seco em capela de exaustão. RNA total obtido foi ressuscitado em 100 µL de água tratada com DEPC (0,1% dietilpirocarbonato) e quantificado em espectrofotômetro Ultraspec 1000 (Pharmacia Biotech) a um comprimento de onda de 260 nm. A avaliação do grau de pureza do RNA extraído foi realizada utilizando a relação A_{260}/A_{280nm} e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™. Todas as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen™), para evitar contaminações por DNA. Para verificar a eficiência do tratamento utilizando DNase I, um PCR foi realizado utilizando RNA como molde e um controle positivo empregando DNA. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™, onde foi confirmada a presença de amplificado apenas no controle positivo, evidenciando que as amostras tratadas com DNase I continham apenas RNA.

4.20.2 Construção dos *primers* para avaliação da expressão por *real time* PCR (qRT-PCR) dos genes *dns*, *aha3441*, *nuc* e 16S rRNA.

Todos os *primers* foram construídos a partir de sequências de DNA de *Aeromonas* depositadas no GenBank utilizando os programas BioEdit 7.0.5.3 e FastPCR 6.0. As sequências dos *primers* correspondentes a cada gene estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências de *primers* utilizados para amplificação dos genes empregados na análise de *Real Time PCR*.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'>3')^a</i>	<i>Tamanho do fragmento amplificado</i>
16S rRNA-F 16S rRNA-R	AGCGTGGGGAGCAAACAGGA CCGTACTCCCCAGGCGGTC	128 pb
DnsqPCR-F DnsqPCR-R	GACATGCACAACCTCTTCC TCCACCAGCATCYGGCACT	116 pb
AHA3441qPCR-F AHA3441qPCR-R	TCGGCAGCTTCAACGTGCTCAA GCATCCGCCTGATCCTTGAC	88 pb
NucqPCR-F NucqPCR-R	TCCAGCCTGGTGGTGACCG TTCTGGGTGCACTTGATGAC	101 pb

^aY= C/T.

4.20.3 Transcrição reversa para obtenção de cDNA

A partir do RNA total extraído, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen™). As reações envolvendo a síntese de cDNA foram realizadas em um volume final de 20 µL. Brevemente, cada reação inicialmente foi constituída por 1 µL de *Random Hexamer primers* (50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 500 ng de RNA total e o volume completado para 12 µL com água tratada com DEPC (*Diethylpyrocarbonate*). Esta reação foi misturada e incubada a 65°C por 5 min. e imediatamente após, mantida em gelo. Após esta incubação inicial, adicionou-se a reação 4 µL de 5x *First-Strand Buffer*, 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de RNaseOUT™ (40U/µL). A reação foi então misturada gentilmente e incubada a 37°C por 2 min. Em seguida, 1 µL de *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse* (M-MLV 200 U/µL) foi adicionado à reação e esta incubada inicialmente a 25°C por um minuto, seguida por uma nova incubação de 37°C por 50 min. Após este período, a reação foi inativada por uma incubação de 15 min. a 70°C. O cDNA obtido

foi então diluído na proporção de 1:50 e um RT-PCR foi realizado para a confirmação de sua síntese.

4.20.4 Amplificação por *real time* PCR (RT-q-PCR)

As reações de amplificação foram realizadas utilizando *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG* (Invitrogen[™]) em um volume total de 20 µL. Brevemente, a reação de RT-qPCR foi constituída de 10 µL da solução de *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG 2x*, 10 µM de cada *primer*; 4 µL de água DEPC e 4 µL de amostra de cDNA diluída na proporção de 1/50. As amplificações foram realizadas em 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems[™]) programado para os seguintes ciclos: 50°C por 2 min., 95°C por 10 min., seguidos de 45 ciclos correspondentes a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para garantir a especificidade da amplificação foi realizada uma curva de desnaturação (*Melting Curve*) com temperatura variando de 60-95°C e acréscimo de 0,3°C por ciclo. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata.

4.20.5 Análise dos resultados obtidos via *real time* PCR (RT-qPCR)

A avaliação dos resultados obtidos foi realizada mediante análise da expressão comparativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de quantificação relativa é calculado com base no ΔC_t (diferença entre o C_t^{amostra} e o $C_t^{\text{gene constitutivo}}$), o $\Delta\Delta C_t$ é calculado pela diferença do $\Delta C_t^{\text{amostra}}$ em relação à média do $\Delta C_t^{\text{controle}}$ utilizado por fim para o cálculo empregando $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.21 Análise *in silico* de bioinformática

As sequências nucleotídicas e proteicas foram comparadas empregando o programa BLAST com o auxílio dos algoritmos BLASTn e BLASTp disponíveis em www.ncbi.nih.gov/Blast. Para o alinhamento das sequências utilizou-se o programa

BioEdit 7.0 empregando a ferramenta ClustalW. A identificação dos peptídeos sinais das proteínas secretadas foi realizado através dos modelos de “neural networks” (NN) e de Markov (HMM) com o auxílio do programa computacional SignalP 3.0. Para a determinação da estrutura secundária e modelagem tridimensional utilizou-se os *web servers* PROMALS disponível em www.prodata.swmed.edu, DALI disponível em www.ekhidna.biocenter.helsinki.fi e Phyre² disponível em www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2. A predição de ligantes e de sítio ativo foi realizada empregando os *web servers* 3DligandSite disponível em www.sbg.bio.ic.ac.uk e EXIA2 disponível em www.203.64.84.196. Como visualizador dos modelos tridimensionais foi utilizado o programa PdbViewer versão 4.1.

4.22 Análises estatísticas

Dependendo da sua natureza e objetivos, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com comparação de médias através do teste de Tukey, análise multivariada com determinação de distâncias de Jaccard, análise de agrupamentos utilizando o algoritmo UPGMA, ou análise de correlação pelo teste de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SPSS for Windows versão 18.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade DNásica extracelular semi-quantitativa de *Aeromonas* spp

As aeromonas são conhecidas pela sua capacidade de produção de uma gama de enzimas e toxinas extracelulares. Entre as enzimas extracelulares de *Aeromonas* spp., as nucleases podem desempenhar um importante papel nutricional e, em alguns casos, têm sido apontadas como um dos muitos fatores de virulência produzidos por estas bactérias (Focareta & Manning, 1987; Gosling, 1996; Pemberton *et al.* 1997; Hsia *et al.*, 2005). Além disso, as nucleases extracelulares e periplasmáticas representam uma barreira à entrada de DNA exógeno, incluindo plasmídeos, por transformação ou eletroporação (Focareta & Manning, 1987; Moulard *et al.*, 1993; Kawagishi *et al.*, 1994).

Com o objetivo de avaliar a atividade DNásica extracelular em *Aeromonas* spp., 48 bactérias foram analisadas quanto à capacidade de formação de halos em meio DNase Test Agar (MERCK), acrescido de 0,01 g/L de azul de toluidina. A atividade nucleásica extracelular foi evidenciada pela presença de halos com coloração metacromática variando de rosa a púrpura em torno das colônias, proveniente da liberação de nucleotídeos e consequente despolarização do corante em relação ao DNA intacto, conforme pode ser observado na Figura 1.

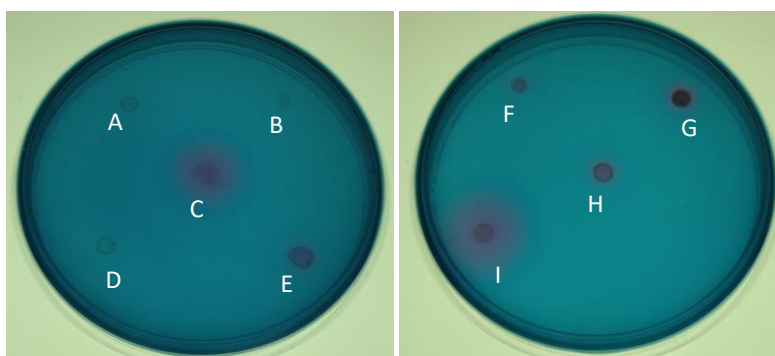


Figura 1. Atividade DNásica semi-quantitativa em placas de DNase Test Agar acrescido de 0,01% de Azul de Toluidina. A- IBAer016; B- IBAer017; C- IBAer101; D- IBAer102; E- IBAer103; F- IBAer105; G- IBAer106; H- IBAer117 e I- IBAer119.

A análise da relação entre o diâmetro de halos e de colônias (Tabela 8) permitiu evidenciar ampla e significativa variação na atividade DNásica extracelular, sendo 10,4% dos isolados classificados como de elevada atividade, 52,1% de atividade moderada, e 37,5% sem atividade aparente após 24 h de cultivo.

Tabela 8. Atividade DNásica em placas de *DNase Test Agar* após 24 h.

Código	Espécie	Atividade DNásica Relativa em Placas (24 h)* ¹	Código	Espécie	Atividade DNásica Relativa em Placas (24 h)* ¹
IBAer001	<i>A. sobria</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer110	<i>A. sobria</i>	1,20±0,00 ^{CDE}
IBAer002	<i>A. hydrophila</i>	3,87±0,18 ^{AB}	IBAer111	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer003	<i>A. ichthiosmia</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer112	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer004	<i>A. media</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer113	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{CDE}
IBAer005	<i>A. salmonicida</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer114	<i>A. hydrophila</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer006	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer115	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer007	<i>A. hydrophila</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer116	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer008	<i>A. caviae</i>	1,20±0,00 ^{CDE}	IBAer117	<i>A. hydrophila</i>	1,10±0,14 ^{DE}
IBAer009	<i>A. caviae</i>	1,20±0,00 ^{CDE}	IBAer119	<i>A. hydrophila</i>	4,25±0,00 ^A
IBAer010	<i>A. sobria</i>	3,62±0,18 ^B	IBAer120	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer011	<i>A. trota</i>	1,70±0,06 ^C	IBAer141	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer012	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{CDE}	IBAer142	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer013	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{CDE}	IBAer144	<i>A. hydrophila</i>	4,25±0,00 ^A
IBAer014	<i>A. encheleia</i>	1,25±0,12 ^{CDE}	IBAer145	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer015	<i>A. veronii</i> var. <i>sobria</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer146	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer016	<i>A. eucrenophila</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer150	<i>A. hydrophila</i>	1,12±0,18 ^{DE}
IBAer017	<i>A. allosaccharophila</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer151	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer101	<i>A. hydrophila</i>	3,75±0,18 ^{AB}	IBAer153	<i>A. caviae</i>	1,00±0,00 ^{DE}
IBAer102	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer155	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer103	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{CDE}	IBAer157	<i>A. hydrophila</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer105	<i>A. caviae</i>	1,12±0,18 ^{DE}	IBAer158	<i>A. hydrophila</i>	1,66±0,18 ^{CD}
IBAer106	<i>A. hydrophila</i>	1,35±0,21 ^{CDE}	IBAer159	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^F
IBAer107	<i>A. caviae</i>	1,12±0,18 ^{DE}	IBAer165	<i>A. trota</i>	1,40±0,20 ^{CDE}
IBAer109	<i>A. hydrophila</i>	0,00±0,00 ^F	IBAer167	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{CDE}

* Atividade relativa = [Diâmetro do Halo/Diâmetro da Colônia]. ¹ Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

Com o intuito de avaliar possíveis diferenças no tempo de expressão e/ou secreção destas enzimas, os mesmos isolados foram mantidos sob as mesmas condições de incubação e as atividades extracelulares foram novamente avaliadas após 48 h. Os resultados observados na Tabela 9 permitiram constatar que alguns isolados que exibiram ausência de atividade com 24 h (IBAer001, IBAer006, IBAer007, IBAer109, IBAer155, IBAer157 e IBAer159), apresentaram halo de degradação de DNA após 48 h

de incubação. Entretanto, os isolados IBAer003, IBAer004, IBAer005, IBAer015, IBAer016, IBAer017, IBAer102, IBAer114, IBAer141, IBAer142 e IBAer146, continuaram exibindo ausência de atividade DNásica, mesmo após 48 h de incubação.

Tabela 9. Atividade DNásica relativa em placas de *DNase Test Agar* após 48 h.

Código	Espécie	Atividade DNásica Relativa em Placas (48 h)* ¹	Código	Espécie	Atividade DNásica Relativa em Placas (48 h)* ¹
IBAer001	<i>A. sobria</i>	1,00±0,00 ^G	IBAer110	<i>A. sobria</i>	1,57±0,03 ^{EF}
IBAer002	<i>A. hydrophila</i>	4,30±0,14 ^B	IBAer111	<i>A. hydrophila</i>	1,17±0,03 ^{EFG}
IBAer003	<i>A. ichthiosmia</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer112	<i>A. hydrophila</i>	1,17±0,03 ^{EFG}
IBAer004	<i>A. media</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer113	<i>A. hydrophila</i>	1,40±0,14 ^{EFG}
IBAer005	<i>A. salmonicida</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer114	<i>A. hydrophila</i>	0,00±0,00 ^H
IBAer006	<i>A. caviae</i>	1,37±0,17 ^{EFG}	IBAer115	<i>A. hydrophila</i>	1,22±0,03 ^{EFG}
IBAer007	<i>A. hydrophila</i>	1,12±0,17 ^{FG}	IBAer116	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,07 ^{EFG}
IBAer008	<i>A. caviae</i>	1,70±0,14 ^{DE}	IBAer117	<i>A. hydrophila</i>	1,45±0,07 ^{EFG}
IBAer009	<i>A. caviae</i>	1,55±0,07 ^{EFG}	IBAer119	<i>A. hydrophila</i>	5,30±0,14 ^A
IBAer010	<i>A. sobria</i>	5,00±0,00 ^A	IBAer120	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^G
IBAer011	<i>A. trota</i>	2,57±0,24 ^C	IBAer141	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^H
IBAer012	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{EFG}	IBAer142	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^H
IBAer013	<i>A. hydrophila</i>	1,40±0,00 ^{EFG}	IBAer144	<i>A. hydrophila</i>	5,10±0,14 ^A
IBAer014	<i>A. encheleia</i>	1,41±0,12 ^{EFG}	IBAer145	<i>A. hydrophila</i>	1,22±0,03 ^{EFG}
IBAer015	<i>A. veronii</i> var. <i>sobria</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer146	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^H
IBAer016	<i>A. eucrenophila</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer150	<i>A. hydrophila</i>	1,22±0,03 ^{EFG}
IBAer017	<i>A. allosaccharophila</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer151	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^G
IBAer101	<i>A. hydrophila</i>	4,90±0,14 ^A	IBAer153	<i>A. caviae</i>	1,00±0,00 ^G
IBAer102	<i>A. caviae</i>	0,00±0,00 ^H	IBAer155	<i>A. caviae</i>	1,25±0,00 ^{EFG}
IBAer103	<i>A. hydrophila</i>	1,62±0,17 ^{EFG}	IBAer157	<i>A. hydrophila</i>	1,25±0,00 ^{EFG}
IBAer105	<i>A. caviae</i>	1,25±0,35 ^{EFG}	IBAer158	<i>A. hydrophila</i>	1,66±0,18 ^{DEF}
IBAer106	<i>A. hydrophila</i>	2,15±0,49 ^{CD}	IBAer159	<i>A. caviae</i>	1,14±0,00 ^{FG}
IBAer107	<i>A. caviae</i>	1,37±0,32 ^{EFG}	IBAer165	<i>A. trota</i>	1,40±0,00 ^{EFG}
IBAer109	<i>A. hydrophila</i>	1,00±0,00 ^G	IBAer167	<i>A. hydrophila</i>	1,37±0,03 ^{EFG}

* Atividade relativa = [Diâmetro do Halo/Diâmetro da Colônia]. ¹ Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

De um modo geral, 77,1% das bactérias avaliadas apresentaram atividade DNásica em placas após 48h de incubação. Dentre os isolados de *A. hydrophila* avaliados, 96% apresentaram atividade DNásica em placas após 48 h de incubação, enquanto que para *A. caviae*, halos de degradação de DNA foram observados em 81,8% dos isolados. Considerando as espécies *A. sobria* e *A. trota*, 100% dos isolados apresentaram atividade após 48 h de incubação. As maiores atividades relativas foram observadas para três isolados de *A. hydrophila* (IBAer119, IBAer144, IBAer101) e um

isolado de *A. sobria* (IBAer010), conforme demonstrado na Tabela 9.

Variações na atividade DNásica, ou mesmo a ausência de atividade em algumas linhagens, foram previamente evidenciado por Abbott *et al.* (2003) e por Castro-Escarpulli *et al.* (2003), em estudo envolvendo isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. No estudo realizado por Abbott *et al.* (2003), que avaliou a frequência de distintos fatores de virulência, entre eles nucleases, em diferentes espécies de *Aeromonas*, foi possível observar uma ampla variação no percentual de detecção das atividades DNásicas entre as 14 espécies avaliadas. Dentre as espécies com maior frequência na produção de DNases extracelulares em placas se destacaram *A. hydrophila*, *A. trota* e *A. encheleia*, com atividades detectadas em 100% dos isolados, seguidos por *A. jandaei* e *A. caviae* com atividades detectadas em 93% dos isolados. Já nos estudos realizados por Castro-Escarpulli *et al.* (2003), o qual, avaliou a ocorrência de fatores de virulência entre 82 isolados de cinco diferentes espécies de *Aeromonas*, sendo elas, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* biovar. *sobria*, e *A. Encheleia*, foi possível constatar que 100% dos isolados, independente da espécie, apresentaram atividade DNásica em placas. Por outro lado, um estudo realizado por Chu *et al.* (2013), envolvendo 24 isolados de *A. hydrophila*, permitiu evidenciar atividade DNásica em placas em apenas 50% das bactérias avaliadas.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, a detecção de atividade DNásica apenas após 48 h de cultivo em alguns isolados, pode representar expressão ou secreção tardia destas enzimas, especialmente considerando que o crescimento de todos os isolados foi muito semelhante. O fato de que alguns isolados não apresentaram atividades DNásicas mesmo após 48 h, pode estar relacionados à ineficiência no sistema de secreção destas enzimas nas condições testadas ou mesmo a características genéticas inerentes ao próprio isolado. O método de *screening* em placas para avaliação da

atividade DNásica se mostrou eficiente. No entanto, as condições de cultivo e o período de avaliação devem ser considerados.

Apesar de estudos avaliando a atividade DNásica extracelular em *Aeromonas* spp. serem relativamente comuns, nenhum trabalho prévio avaliou a variação no tempo de expressão e/ou secreção destas enzimas em placas nestas bactérias.

5.2 Quantificação da atividade DNásica extracelular de *Aeromonas* spp.

Visando complementar a análise de atividade DNásica extracelular, foi realizada a quantificação da atividade DNásica de extratos extracelulares brutos obtidos a partir do sobrenadante de cultivo após crescimento dos 48 isolados de *Aeromonas* em meio LB a 37°C com agitação constante por 20 h.

Conforme mostram os resultados da Tabela 10, ampla e significativa variação entre isolados foi observada na atividade DNásica sobre DNA de espermatozoides de salmão, sendo a maior atividade de 48,25 U.mL⁻¹. min⁻¹ para o isolado IBAer007 de *A. hydrophila* e a menor atividade 1,50 U.mL⁻¹. min⁻¹ para o isolado IBAer156 de *A. caviae*. Atividades elevadas também foram observadas para os isolados IBAer016, IBAer001, IBAer010, IBAer144, IBAer119 e IBAer002 (Tabela 10). Apesar das DNases extracelulares serem consideradas fatores de virulência em *Aeromonas* spp. (Castro-Escarpulli *et al.* 2003, Chu *et al.* 2013), não foram constatadas diferenças quantitativas significativas na atividade DNásica total entre isolados clínicos e ambientais. Apesar disso, quando considerados os isolados que apresentaram atividades superiores a 20 U.mL⁻¹. min⁻¹, a maior parte consiste em isolados de origem ambiental, sugerindo um papel predominantemente nutricional ou de proteção a entrada de DNA exógeno destas enzimas para estas bactérias em particular.

Tabela 10. Quantificação da atividade DNásica de extratos extracelulares sobre DNA de esperma de salmão para 48 isolados de *Aeromonas* spp.

Código	Espécie	Atividade DNásica ¹ U.mL ⁻¹ .min ⁻¹	Código	Espécie	Atividade DNásica ¹ U.mL ⁻¹ .min ⁻¹
IBAer001	<i>A. sobria</i>	31,33±2,12 ^C	IBAer110	<i>A. sobria</i>	18,75±1,29 ^F
IBAer002	<i>A. hydrophila</i>	23,25±0,82 ^E	IBAer111	<i>A. hydrophila</i>	9,75±1,06 ^{GHIJKL}
IBAer003	<i>A. ichthiosmia</i>	8,25±0,59 ^{HIJKLMN}	IBAer112	<i>A. hydrophila</i>	12,58±0,12 ^G
IBAer004	<i>A. media</i>	5,92±0,11 ^{LMNOPQRST}	IBAer113	<i>A. hydrophila</i>	3,75±0,35 ^{PQRSTU}
IBAer005	<i>A. salmonicida</i>	7,08±2,00 ^{IJKLMNOPQ}	IBAer114	<i>A. hydrophila</i>	18,58±0,12 ^F
IBAer006	<i>A. caviae</i>	6,66±0,47 ^{KLMNOPQRS}	IBAer115	<i>A. hydrophila</i>	5,42±0,12 ^{MNOPQRSTU}
IBAer007	<i>A. hydrophila</i>	48,25±0,59 ^A	IBAer116	<i>A. hydrophila</i>	11,33±1,18 ^{GH}
IBAer008	<i>A. caviae</i>	6,75±0,12 ^{KLMNOPQR}	IBAer117	<i>A. hydrophila</i>	18,16±0,94 ^F
IBAer009	<i>A. caviae</i>	6,66±1,65 ^{KLMNOPQRS}	IBAer119	<i>A. hydrophila</i>	24,08±0,12 ^E
IBAer010	<i>A. sobria</i>	29,67±0,23 ^{CD}	IBAer120	<i>A. hydrophila</i>	9,42±0,35 ^{GHIJKL}
IBAer011	<i>A. trota</i>	4,75±0,12 ^{NOPQRSTU}	IBAer141	<i>A. caviae</i>	3,42±0,12 ^{KRSTU}
IBAer012	<i>A. hydrophila</i>	7,17±0,70 ^{IJKLMNOPQ}	IBAer142	<i>A. caviae</i>	2,00±1,17 ^{TU}
IBAer013	<i>A. hydrophila</i>	4,00±0,23 ^{OPQRSTU}	IBAer144	<i>A. hydrophila</i>	25,83±1,41 ^{DE}
IBAer014	<i>A. encheleia</i>	9,75±0,35 ^{GHIJKL}	IBAer145	<i>A. hydrophila</i>	11,00±0,71 ^{GHI}
IBAer015	<i>A. veronii</i> var. <i>sobria</i>	8,92±0,35 ^{GHIJKLM}	IBAer146	<i>A. caviae</i>	7,66±0,47 ^{HIJKLMNOP}
IBAer016	<i>A. eucrenophila</i>	43,66±2,36 ^B	IBAer150	<i>A. hydrophila</i>	7,75±0,12 ^{HIJKLMNO}
IBAer017	<i>A. allosaccharophila</i>	3,08±0,82 ^{RSTU}	IBAer151	<i>A. hydrophila</i>	2,33±0,23 ^{TU}
IBAer101	<i>A. hydrophila</i>	18,33±2,36 ^F	IBAer153	<i>A. caviae</i>	2,75±0,12 ^{STU}
IBAer102	<i>A. caviae</i>	8,00±0,23 ^{HIJKLMN}	IBAer155	<i>A. caviae</i>	3,42±0,35 ^{QRSTU}
IBAer103	<i>A. hydrophila</i>	12,66±0,23 ^G	IBAer157	<i>A. hydrophila</i>	4,33±0,23 ^{NOPQRSTU}
IBAer105	<i>A. caviae</i>	10,25±1,06 ^{GHIJK}	IBAer158	<i>A. hydrophila</i>	2,50±0,23 ^{TU}
IBAer106	<i>A. hydrophila</i>	6,83±0,47 ^{IJKLMNOPQR}	IBAer159	<i>A. caviae</i>	1,50±0,24 ^U
IBAer107	<i>A. caviae</i>	33,08±0,11 ^C	IBAer165	<i>A. trota</i>	3,91±0,60 ^{OPQRSTU}
IBAer109	<i>A. hydrophila</i>	10,75±2,00 ^{GHIJ}	IBAer167	<i>A. hydrophila</i>	3,08±0,60 ^{RSTU}

¹ Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

Visando a verificar a existência de nucleases termopstáveis em *Aeromonas* spp., os extratos extracelulares dos 48 isolados foram submetidos a um tratamento térmico de 100°C por 10 min. e posteriormente suas atividades DNásicas foram avaliadas. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 11, todos os isolados apresentaram uma redução na atividade DNásica, após o tratamento térmico. No entanto, a maior atividade DNásica após o tratamento térmico foi observada para o isolado de *A. hydrophila* IBAer119 com 14,08 U.mL⁻¹. min⁻¹, correspondendo a 58,47% de atividade remanescente. Além disso, os isolados de *A. hydrophila* IBAer002 e *A. sobria* IBAer010 também demonstraram elevada atividade DNásica após o tratamento térmico com valores de 11,42 U.mL⁻¹. min⁻¹ e 12,50 U.mL⁻¹. min⁻¹, e com atividades remanescentes da ordem de 49, 12% e 42,13%, respectivamente.

Tabela 11. Quantificação da atividade DNásica de extratos extracelulares após aquecimento, sobre DNA de esperma de salmão para 48 isolados de *Aeromonas* spp.

Código	Espécie	Atividade DNásica ¹ U.mL ⁻¹ .min ⁻¹	Código	Espécie	Atividade DNásica ¹ U.mL ⁻¹ .min ⁻¹
IBAer001	<i>A. sobria</i>	5,83±0,47 ^{BCDEF}	IBAer110	<i>A. sobria</i>	4,33±1,65 ^{BCDEFGHI}
IBAer002	<i>A. hydrophila</i>	11,42±1,76 ^A	IBAer111	<i>A. hydrophila</i>	3,08±0,35 ^{CDEFGHIJ}
IBAer003	<i>A. ichthiosmia</i>	5,83±0,23 ^{BCDEF}	IBAer112	<i>A. hydrophila</i>	0,92±0,12 ^{IJ}
IBAer004	<i>A. media</i>	2,42±0,59 ^{DEFGHIJ}	IBAer113	<i>A. hydrophila</i>	2,08±0,12 ^{FGHIJ}
IBAer005	<i>A. salmonicida</i>	4,50±1,17 ^{BCDEFGHI}	IBAer114	<i>A. hydrophila</i>	1,75±0,12 ^{HIJ}
IBAer006	<i>A. caviae</i>	3,08±1,53 ^{CDEFGHIJ}	IBAer115	<i>A. hydrophila</i>	2,25±1,30 ^{DEFGHIJ}
IBAer007	<i>A. hydrophila</i>	7,08±1,76 ^B	IBAer116	<i>A. hydrophila</i>	6,25±2,95 ^{BC}
IBAer008	<i>A. caviae</i>	0,91±0,12 ^{IJ}	IBAer117	<i>A. hydrophila</i>	3,58±0,82 ^{BCDEFGHIJ}
IBAer009	<i>A. caviae</i>	4,50±0,47 ^{BCDEFGHI}	IBAer119	<i>A. hydrophila</i>	14,08±0,12 ^A
IBAer010	<i>A. sobria</i>	12,50±0,70 ^A	IBAer120	<i>A. hydrophila</i>	4,08±0,35 ^{BCDEFGHIJ}
IBAer011	<i>A. trota</i>	2,92±0,35 ^{CDEFGHIJ}	IBAer141	<i>A. caviae</i>	1,33±0,23 ^{HIJ}
IBAer012	<i>A. hydrophila</i>	4,25±0,59 ^{BCDEFGHI}	IBAer142	<i>A. caviae</i>	1,08±0,12 ^{HIJ}
IBAer013	<i>A. hydrophila</i>	1,42±0,59 ^{HIJ}	IBAer144	<i>A. hydrophila</i>	6,00±0,47 ^{BCDE}
IBAer014	<i>A. encheleia</i>	1,08±0,12 ^{HIJ}	IBAer145	<i>A. hydrophila</i>	3,83±0,47 ^{BCDEFGHIJ}
IBAer015	<i>A. veronii</i> var. <i>sobria</i>	3,25±0,13 ^{CDEFGHIJ}	IBAer146	<i>A. caviae</i>	5,58±0,12 ^{BCDEFG}
IBAer016	<i>A. eucrenophila</i>	6,08±0,12 ^{BCD}	IBAer150	<i>A. hydrophila</i>	3,08±1,06 ^{CDEFGHIJ}
IBAer017	<i>A. allosaccharophila</i>	1,00±0,47 ^{HIJ}	IBAer151	<i>A. hydrophila</i>	0,92±0,35 ^{IJ}
IBAer101	<i>A. hydrophila</i>	4,75±1,53 ^{BCDEFGH}	IBAer153	<i>A. caviae</i>	0,92±0,12 ^{IJ}
IBAer102	<i>A. caviae</i>	1,75±0,59 ^{HIJ}	IBAer155	<i>A. caviae</i>	1,75±0,35 ^{HIJ}
IBAer103	<i>A. hydrophila</i>	3,92±0,59 ^{BCDEFGHIJ}	IBAer157	<i>A. hydrophila</i>	0,83±0,23 ^{IJ}
IBAer105	<i>A. caviae</i>	1,50±0,47 ^{HIJ}	IBAer158	<i>A. hydrophila</i>	1,66±0,35 ^{HIJ}
IBAer106	<i>A. hydrophila</i>	2,92±0,12 ^{CDEFGHIJ}	IBAer159	<i>A. caviae</i>	0,42±0,35 ^I
IBAer107	<i>A. caviae</i>	2,92±0,59 ^{CDEFGHIJ}	IBAer165	<i>A. trota</i>	2,00±0,94 ^{GHIJ}
IBAer109	<i>A. hydrophila</i>	3,42±1,53 ^{BCDEFGHIJ}	IBAer167	<i>A. hydrophila</i>	1,33±0,94 ^{HIJ}

¹ Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

Para os isolados IBAer007, IBAer001, IBAer144 e IBAer016, os quais apresentavam uma elevada atividade DNásica em extratos extracelulares brutos não tratados termicamente, uma consistente queda na atividade foi observada para extratos tratados termicamente (Tabela 10 e 11). Estas variações nas atividades podem estar relacionadas à presença de DNases termoestáveis específicas ou à presença de DNases com grande capacidade de *re-folding* após o tratamento térmico. Embora DNases termoestáveis, tenham sido identificadas em *S. aureus* (Tang *et al.*, 2008), nenhum trabalho prévio foi realizado objetivando caracterizar a atividade de DNases extracelulares termoestáveis ou não em *Aeromonas* spp. ou qualquer outra bactéria tornando difícil a comparação dos resultados obtidos.

5.3 Avaliação da variabilidade nos repertórios de DNases extracelulares de *Aeromonas* spp.

Em virtude da ausência de estudos comparativos relacionados à identificação de DNases extracelulares em *Aeromonas* spp., passamos a avaliar a diversidade destas enzimas nos 48 isolados de distintas espécies de *Aeromonas* por meio de zimogramas. Para tanto, os isolados foram crescidos em meio LB (20 h) e seus extratos brutos extracelulares foram submetidos à separação eletroforética em géis de poliacrilamida com gradiente de 8-15% e polimerizados com DNA de esperma de salmão e corados com brometo de etídio.

Considerando todos os isolados avaliados, os zimogramas permitiram a identificação de pelo menos seis bandas correspondendo a proteínas com massas moleculares estimadas entre 22 e 119 KDa, com grande diversidade entre espécies, conforme pode ser apreciado no exemplo da Figura 2.

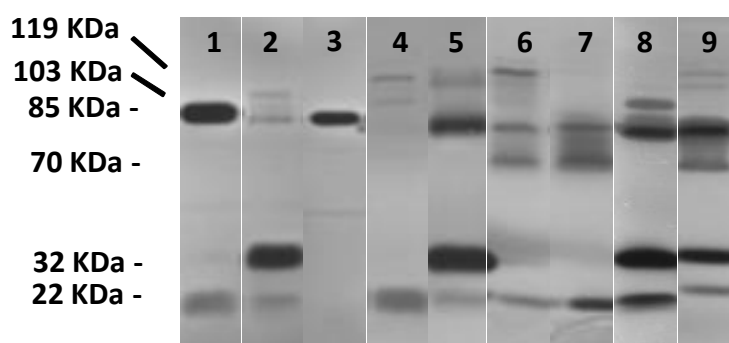


Figura 2. Perfis de DNases extracelulares obtidos em géis de poliacrilamida utilizando DNA de esperma de salmão como substrato para isolados representativos de *Aeromonas* spp. 1- IBAer001, 2- IBAer002, 3- IBAer005, 4- IBAer009, 5- IBAer010, 6- IBAer103, 7- IBAer158, 8- IBAer119 e 9- IBAer144.

Levando em consideração apenas os 23 isolados de *A. hydrophila*, a avaliação dos zimogramas permitiu a identificação de sete diferentes perfis de DNases. O primeiro perfil é caracterizado pela presença de bandas correspondentes a enzimas com massas moleculares de aproximadamente 22 e 85 KDa, ambas com atividades pronunciadas. Neste perfil enquadraram-se 30,4% dos isolados de *A. hydrophila*, sendo assim o perfil com maior representatividade para a espécie. O segundo perfil é caracterizado pela presença de bandas correspondente a enzimas com massas moleculares aparentes de 22, 85, 103 e 119 KDa, verificando uma maior atividade DNásica para a banda de 85 KDa. Já o terceiro perfil caracteriza-se pela presença de bandas com massas moleculares de aproximadamente 22, 32, 70, 85, 103 e 119 KDa, sendo a banda com 32 KDa variável entre os isolados e as bandas de 22 e 85 KDa, apresentando maiores atividades. O quarto perfil é caracterizado pela presença de bandas com massas moleculares de aproximadamente 22, 70, 85 e 103 KDa, sendo esta última banda, variável entre os isolados, e assim como anteriormente, as maiores atividade evidenciadas nas bandas de 22 e 85 KDa. Por sua vez, o quinto perfil é caracterizado pela presença de bandas com massas moleculares aparentes de 22, 32, 85 e 103 KDa, sendo as bandas de 32 e 85 KDa as que apresentam maior atividade. O sexto perfil é bastante semelhante ao quinto, entretanto, ele caracteriza-se pela presença apenas de bandas com massas moleculares de aproximadamente 22, 85 e 103 KDa. Por fim, o sétimo perfil de atividade DNásica é caracterizado pela presença de bandas com massas moleculares aparentes de 85 e 119 KDa e é representado por um único isolado de *A. hydrophila*. A comparação dos resultados obtidos torna-se um tanto difícil em virtude da inexistência de trabalhos avaliando a diversidade de DNases em *Aeromonas* spp., no entanto, a variação em perfis de DNases entre dois isolados de *A. hydrophila*, incluído bandas de pesos moleculares semelhantes aos do presente trabalho, foram obtidos em

estudos realizados por Dodd & Pemberton (1996) e Nam *et al.* (2004).

De acordo com os resultados, todos os isolados clínicos e ambientais de *A. hydrophila* apresentaram uma DNase de massa molecular aparente de 85 KDa. Além disso, com exceção de um único isolado (IBAer103), todos os demais representantes de *A. hydrophila* também apresentaram uma DNase de massa molecular aparente de 22 KDa. Estes resultados sugerem que estas enzimas (85 KDa e 22 KDa) apresentam uma elevada importância para estas bactérias.

Para *A. caviae*, quatro perfis de DNases foram estabelecidos. O primeiro perfil é caracterizado pela presença de bandas correspondentes a enzimas com massa molecular de aproximadamente 22, 85 e 103 KDa, sendo a banda de 103 KDa variável entre os isolados, e com atividades elevadas para as bandas de 22 e 85 KDa. Neste perfil enquadram-se 58,3% dos isolados de *A. caviae* sendo assim o perfil com maior representatividade para a espécie. O segundo perfil é caracterizado pela presença de bandas com massa molecular aparente de 22, 85, 103 e 119 KDa, sendo novamente a banda de 103 KDa variável entre os isolados, e com atividades elevadas para as bandas de 22 e 85 KDa. Já o terceiro perfil é caracterizado pela presença de bandas com massa molecular de aproximadamente 22, 103 e 119 KDa, enquanto que o quarto perfil caracteriza-se pela presença de uma única banda com massa molecular aparente de 85 KDa.

Com a exceção de um único isolado correspondente a *A. media* (IBAer004) o qual não apresentou bandas detectáveis em gel, as demais espécies de *Aeromonas* avaliadas apresentaram perfis DNases compatíveis com os verificados em *A. hydrophila* evidenciando elevada diversidade intra e interespecífica de DNases extracelulares no gênero *Aeromonas*.

A análise de agrupamentos (UPGMA) baseada nos zimogramas permitiu a separação de cinco grupos com ponto de corte arbitrário em 0,60 (Figura 3).

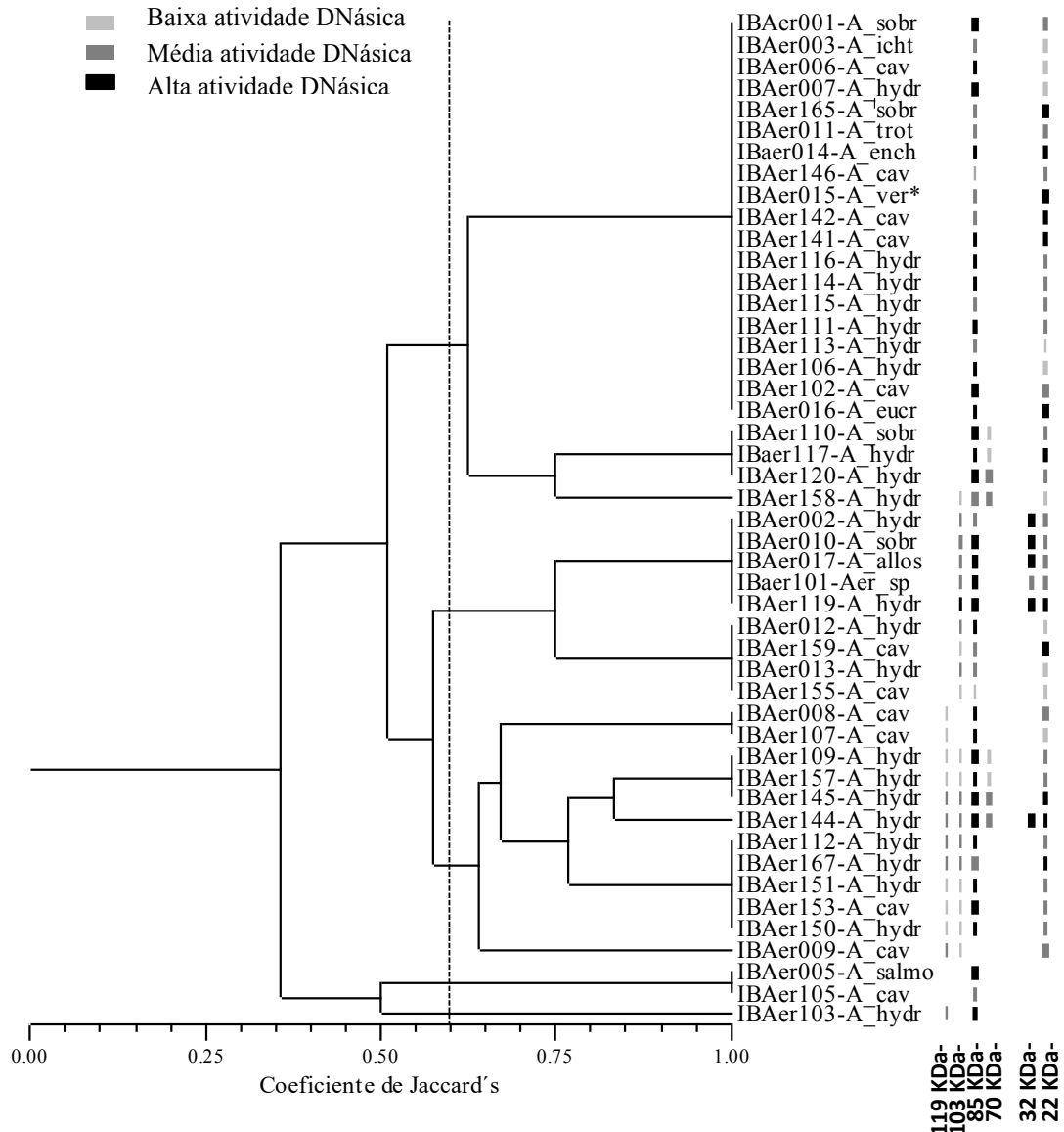


Figura 3. Análise de agrupamento (UPGMA) baseado no perfil de atividade DNásica de *Aeromonas* spp.. Esquema das bandas e suas massas moleculares estimadas. Bandas de coloração diferente indicam diferenças nas intensidades das atividades. **A. veronii* var. *sobria*.

O maior grupo foi formado por 23 isolados correspondendo a 10 isolados de *A. hydrophila*, cinco isolados de *A. caviae*, três isolados de *A. sobria*, e os isolados de *A.*

ichthiosmia, *A. trota*, *A. encheleia*, *A. veronii* var *sobria* e *A. eucrenophila*. O segundo grupo foi formado por nove isolados correspondendo a quatro isolados de *A. hydrophila*, dois isolados de *A. caviae* e os isolados de *A. sobria*, *A. allosaccharophila*, e *Aeromonas* sp. O terceiro grupo foi formado por 12 isolados, sendo este grupo, representado por oito isolados de *A. hydrophila* e quatro isolados de *A. caviae*. Já o quarto grupo foi formado por dois isolados, um correspondendo à *A. caviae* e outro de *A. salmonicida*, enquanto que o quinto grupo foi formado por um único representante de *A. hydrophila*.

De acordo com os resultados obtidos a partir da análise de agrupamento (UPGMA), não foi possível estabelecer relação de grupos espécie-específicos ou específicos de isolados clínicos ou de isolados ambientais, evidenciando mais uma vez a elevada diversidade intra e interespecífica de DNases extracelulares no gênero *Aeromonas* spp.

A avaliação das áreas de degradação correspondente a cada banda detectada nos zimogramas foi realizada. O somatório das áreas de degradação em gel foram estimadas para cada isolado empregando o programa CPAtlas 2.0. Os valores correspondentes ao somatório das áreas das bandas de cada isolado esta representada na Tabela 12.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 12, as maiores áreas de degradação foram detectadas nos isolados, IBAer119, IBAer010, IBAer144 e IBAer017. Enquanto que as menores áreas de degradação foram detectadas nos isolados IBAer003, IBAer115, IBAer155 e IBAer114. Como mencionado anteriormente o isolado IBAer004 não apresentou bandas detectáveis em gel e portanto, foi excluído da análise.

Tabela 12. Somatório das áreas correspondentes as bandas de degradação em géis de poliacrilamida co-polimerizados com DNA se esperma de salmão.

Código	Espécie	Atividade DNásica Área (pixel) ¹	Código	Espécie	Atividade DNásica Área (pixel) ¹
IBAer001	<i>A. sobria</i>	2593±78,48 ^{CDEFG}	IBAer110	<i>A. sobria</i>	1386±296,98 ^{IJKLMNOP}
IBAer002	<i>A. hydrophila</i>	2262±123,03 ^{CDEFGH}	IBAer111	<i>A. hydrophila</i>	905±49,50 ^{NOPQRSTU}
IBAer003	<i>A. ichthiosmia</i>	193±12,02 ^{UV}	IBAer112	<i>A. hydrophila</i>	1026±83,44 ^{MNOPQRST}
IBAer004	<i>A. media</i>	ND	IBAer113	<i>A. hydrophila</i>	547,±115,26 ^{PQRSTUV}
IBAer005	<i>A. salmonicida</i>	1060±99,70 ^{MNOPQRST}	IBAer114	<i>A. hydrophila</i>	265,±33,23 ^{TUV}
IBAer006	<i>A. caviae</i>	593±27,58 ^{OPQRSTUV}	IBAer115	<i>A. hydrophila</i>	242±0,00 ^{TUV}
IBAer007	<i>A. hydrophila</i>	1908±186,67 ^{DEFGHIJK}	IBAer116	<i>A. hydrophila</i>	476,±82,73 ^{QRSTUV}
IBAer008	<i>A. caviae</i>	1332±185,97 ^{KLMNOPQ}	IBAer117	<i>A. hydrophila</i>	1187±0,00 ^{KLMNOPQR}
IBAer009	<i>A. caviae</i>	1131±48,79 ^{BKLMNOPQRS}	IBAer119	<i>A. hydrophila</i>	4647±588,31 ^A
IBAer010	<i>A. sobria</i>	3616,00±315,37 ^B	IBAer120	<i>A. hydrophila</i>	1908±103,24 ^{DEFGHIJK}
IBAer011	<i>A. trota</i>	872±45,25 ^{NOPQRSTU}	IBAer141	<i>A. caviae</i>	1221±23,33 ^{KLMNOPQR}
IBAer012	<i>A. hydrophila</i>	582±157,68 ^{PQRSTUV}	IBAer142	<i>A. caviae</i>	990±189,50 ^{MNOPQRSTU}
IBAer013	<i>A. hydrophila</i>	474±107,48 ^{QRSTUV}	IBAer144	<i>A. hydrophila</i>	3608,5±133,64 ^B
IBAer014	<i>A. encheleia</i>	1854±156,98 ^{EFGHIJL}	IBAer145	<i>A. hydrophila</i>	2659±336,58 ^{CDE}
IBAer015	<i>A. veronii</i> var. <i>sobria</i>	2363±357,09 ^{CDEFGH}	IBAer146	<i>A. caviae</i>	340,±45,96 ^{STUV}
IBAer016	<i>A. eucrenophila</i>	2135±512,65 ^{CDEFGHIJ}	IBAer150	<i>A. hydrophila</i>	975±0,00 ^{NOPQRSTU}
IBAer017	<i>A. allosaccharophila</i>	2760±0,00 ^C	IBAer151	<i>A. hydrophila</i>	1220±0,00 ^{KLMNOPQR}
IBAer101	<i>Aeromonas</i> sp.	1932±265,16 ^{CDEFGHIJK}	IBAer153	<i>A. caviae</i>	1606±0,00 ^{HIJKLMN}
IBAer102	<i>A. caviae</i>	2486±279,30 ^{CDEFG}	IBAer155	<i>A. caviae</i>	246±10,60 ^{TUV}
IBAer103	<i>A. hydrophila</i>	1015±63,64 ^{NMOPQRSTU}	IBAer157	<i>A. hydrophila</i>	1196±4,24 ^{KLMNOPQR}
IBAer105	<i>A. caviae</i>	351,5±2,12 ^{STUV}	IBAer158	<i>A. hydrophila</i>	859±148,49 ^{OPQRSTU}
IBAer106	<i>A. hydrophila</i>	1065,5±143,54 ^{MNOPQRST}	IBAer159	<i>A. caviae</i>	1808±2,82 ^{FGHIJKLM}
IBAer107	<i>A. caviae</i>	716±62,22 ^{OPQRSTUV}	IBAer165	<i>A. trota</i>	2716±196,57 ^{CD}
IBAer109	<i>A. hydrophila</i>	2171±533,16 ^{CDEFGHI}	IBAer167	<i>A. hydrophila</i>	1350±0,00 ^{IJKLMNOPQ}

ND= Não Detectado. ¹ Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

Dentre as seis bandas correspondentes as enzimas detectadas, a banda com massa molecular de aproximadamente 32 KDa foi a que apresentou em média maior área de degradação, seguida pela banda de 85 KDa e pela banda de 22 KDa. No entanto, a banda de 32 KDa apresentou uma menor frequência de ocorrência (12,76%) entre todos os isolados avaliados. As bandas com massa molecular aparente de 22 e 85 KDa foram as que apresentaram maior frequência entre os isolados com valores de 91,48 e 97,87%, respectivamente. As bandas com massa moleculares de aproximadamente 70, 103 e 119 KDa apresentaram áreas de degradação menores em comparação às demais bandas, com reduzida frequência para banda de 70 KDa (17,02%) e frequências intermediárias de 42,55 e 27,65% para bandas de 103 e 119 KDa (Figura 4).

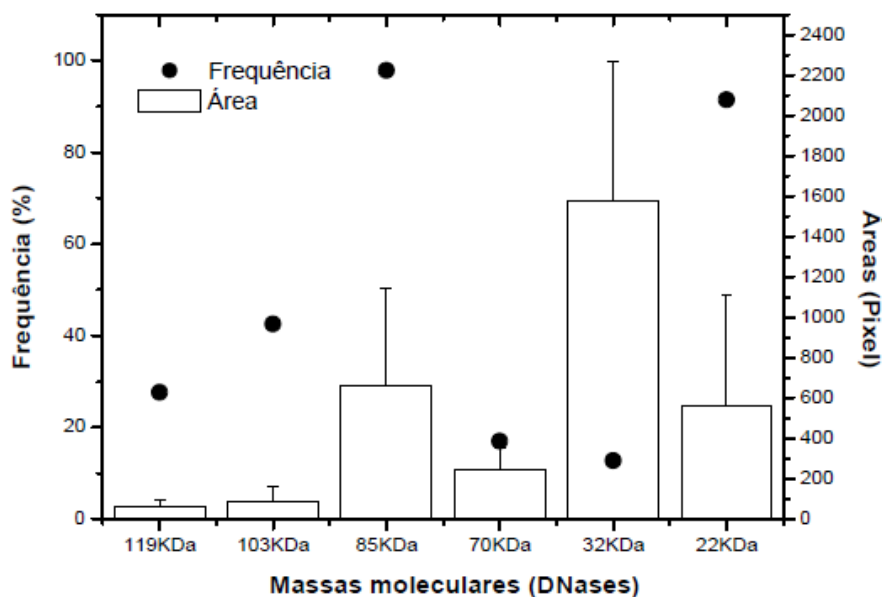


Figura 4. Média da área correspondente a cada banda e sua frequência de distribuição entre os isolados avaliados.

Dentre as bandas identificadas nos zimogramas, a banda de 119 KDa apresentou massa molecular compatível com uma nuclease designada como NucH (114 KDa) descrita por Dodd & Pemberton (1996), em um isolado de *A. hydrophila* JMP636. Já a banda de 103 KDa, pode representar uma variação de NucH inerente a uma desnaturação ou renaturação parcial relacionada ao SDS presente nos géis, o qual pode influenciar na conformação final da enzima. Além disso, nucleases carregadas positivamente podem realizar ligações iniciais com o substrato negativamente carregado presente no gel, refletindo em múltiplas bandas para uma mesma enzima.

Em sistemas de eletroforese nativa a formação de complexos entre nucleases e outras proteínas, ou irrelevantes modificações na carga, devido, por exemplo, a desaminações, podem gerar mais de uma banda de atividade para uma mesma enzima (Rosenthal & Lacks, 1977). A banda com massa molecular estimada em 85 KDa corresponde a uma nuclease com tamanho molecular similar ao observado por Dodd & Pemberton (1996, 1999). Uma busca criteriosa no banco de dados do NCBI (*National*

Center for Biotechnology Information) permitiu identificar uma nuclease com massa molecular compatível (~75 KDa), designada como Aha3441, em diversos isolados de *Aeromonas* spp., indicando tratar-se desta enzima em particular. Considerando a atividade em géis de zimogramas, a banda com massa molecular estimada em 70 KDa pode representar uma parcial degradação de Aha3441 ocasionada pela ação de proteases específicas. Este fato já foi reportado em extratos brutos de *Diplococcus pneumoniae* (Rosenthal & Lacks, 1977). Em *Aeromonas* spp., uma grande quantidade de proteases com atividades sobre diversos tipos de substratos foram reportadas (Zacaria, 2009), indicando a possibilidade de este fato ocorrer de forma similar em algumas bactérias deste gênero. Além disso, uma busca exaustiva no banco de dados do NCBI não permitiu identificar nenhuma nuclease com massa molecular compatível a aquela observada nos géis para espécies do gênero *Aeromonas*.

A banda com massa molecular estimada em 32 KDa apresenta tamanho molecular compatível com uma DNase observada por Dodd & Pemberton (1996, 1999), em um isolado de *A. hydrophila* JMP636. No entanto, esta DNase não foi caracterizada e buscas realizadas no banco de dados do NCBI baseadas nos genomas completamente sequenciados de *Aeromonas* disponíveis não permitiram identificar nenhuma nuclease com massa molecular compatível ou com características condizentes com a atividade observada nos géis, indicando tratar-se de uma DNase ainda desconhecida.

Considerando sua elevada atividade e baixa frequência de ocorrência entre os isolados de *Aeromonas* spp. analisados, esta DNase pode tratar-se de uma nova enzima com origem plasmidial ou mesmo uma DNase proveniente de um elemento de integração presente apenas em alguns isolados. Um elemento de integração denominado CJIE1 foi descrito em *Campylobacter jejuni*. Dentre os 32 genes de interesse contidos em CJIE1, 16 foram anotados como genes codificadores de proteínas relacionadas a

fagos, 12 genes foram anotados como proteínas hipotéticas, três genes foram anotados como genes codificadores de proteínas com domínios conservados e um gene foi anotado como um gene codificando para uma DNase extracelular, o qual foi relacionado com a inibição de transformações naturais em *Campylobacter jejuni* (Gaasbeek *et al.* 2009). Esta DNase extracelular apresentou elevada similaridade a nível proteico com a DNase conhecida como Dns de *A. hydrophila*.

Bactérias do gênero *Aeromonas* possuem muitas características que são comuns em outras bactérias Gram-negativas naturalmente competentes tais como, pili tipo IV (Barnett *et al.*, 1997), sistema de secreção tipo III (Wiesner *et al.*, 2003), e capacidade de formação de biofilme (Kirov *et al.*, 2004). O completo sequenciamento do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 indicou a presença de uma proteína competente/ dano-induzido CinA e de uma proteína relacionada à internalização de DNA denominada ComEC/Rec2 (Seshadri *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por Huddleston *et al.* (2013) confirmou que bactérias do gênero *Aeromonas* são aptas a adquirir competência de forma natural tornando possível a integração de genes provenientes de outros organismos. Além disso, uma série de plasmídeos e transposons contendo genes de resistência a antibióticos e outras enzimas consideradas como fatores de virulência foram encontrados em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. (Rodhes *et al.*, 2000). Este conjunto de fatos indica a possibilidade de transferência genes entre diferentes gêneros bacterianos tornando possível que o fenômeno evidenciado em *C. jejuni* também possa ocorrer em bactérias do gênero *Aeromonas*. No entanto, cabe ressaltar que estudos específicos devem ser realizados a fim de corroborar esta hipótese.

Por fim, a banda com massa molecular estimada em 22 KDa apresenta tamanho molecular compatível com uma nuclease designada como Dns (25 KDa) descrita por

Chang *et al.* (1992), Dodd & Pemberton (1996) e Nam *et al.* (2004) nos isolados CHC-1, JMP636 e ATCC14715 de *A. hydrophila*.

Muitos são os métodos empregados para detectar e/ou quantificar a atividade de DNases extracelulares. Na análise de zimogramas é possível uma avaliação semi-quantitativa direta da atividade das várias enzimas com atividade nucleásica (Rosenthal & Lacks, 1977, Muro-Pastor *et al.* 1992), enquanto que métodos espectrofotométricos permitem uma avaliação quantitativa da atividade nucleásica total, baseada na quantidade de ácidos nucléicos solúveis liberados a partir da hidrólise de moléculas de DNA ou RNA (Kunitz, 1950). A análise em placas também é considerada um método eficiente para a detecção e avaliação qualitativa de nucleases extracelulares (Kageyama, 1970; Lachica *et al.*, 1972).

As correlações entre a atividade DNásica extracelular detectada nos zimogramas, atividade DNásica extracelular quantitativa avaliada por espectrofotometria, e atividade DNásica extracelular avaliada em placas (DNase Test Agar) foram estabelecidas de forma independente. Para a análise foram comparadas a soma das áreas de degradação das DNases extracelulares obtidas em géis empregando DNA de esperma de salmão como substrato, as atividades DNásica extracelulares quantitativas obtidas mediante avaliação espectrofotométricas e a relação entre o diâmetro das colônias e o halo de degradação de DNA avaliado em placas de DNase Test Agar, após 48 h de incubação.

A análise de correlação entre a atividade avaliada nos zimogramas e a atividade quantitativa estabelecida por espectrofotometria, indicou uma correlação positiva de 0.681 em um nível de significância de $p=0,01$ (Figura 5).

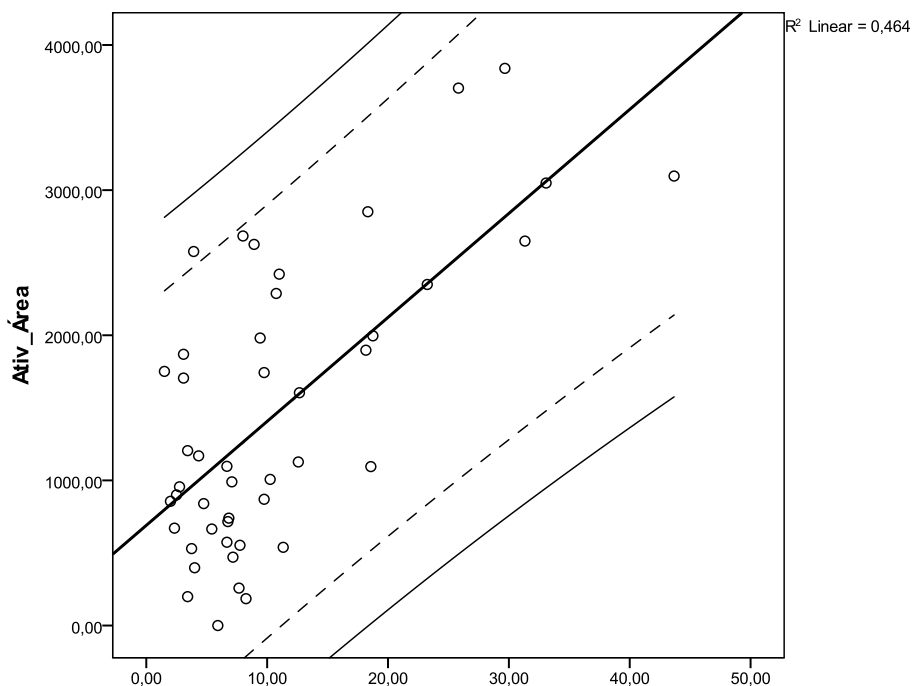


Figura 5. Relação entre a atividade quantitativa (espectrofotométrica - U/mL/min) e pelo somatório das áreas (pixel) das bandas (zimogramas). Linhas tracejadas e normais paralelas a regressão indicam intervalo de confiança de 95 e 99%, respectivamente.

Cabe ressaltar que os isolados IBAer007 e IBAer119 foram excluídos desta análise em virtude da elevada atividade quantitativa observada para o isolado IBAer007 e pela elevada área de degradação observada para o isolado IBAer119, as quais fogem da linearidade. É importante considerar que o isolado IBAer007 apresenta uma elevada atividade quantitativa (48,25 U/mL/min), e uma mediana atividade de degradação em zimogramas (área=1908 pixel) sendo a maior parte desta atividade (86,5%), atribuída a uma DNase com massa molecular aparente de 85 KDa. Por outro lado, o isolado IBAer119 apresenta uma moderada/alta atividade quantitativa (24,08U/mL/min) e uma elevada atividade de degradação em zimogramas (área=4647 pixel) com destaque para DNases com massas moleculares aparentes de 22 e 32 KDa, as quais correspondem a 73,4% da atividade total detectada em géis. Com base nestes resultados, acredita-se que a DNase com massa molecular aparente de 85 KDa, apresente uma menor capacidade de difusão em géis de zimograma em comparação as DNases de 22 e 32 KDa, refletindo

em uma área de degradação menor. Por outro lado, a elevada área de degradação em zimogramas observados em IBAer119, pode refletir uma maior capacidade de difusão das DNases de menor massa molecular resultando consequentemente em maiores áreas de degradação, as quais fogem da linearidade da avaliação.

A análise comparativa entre a atividade quantitativa estabelecida por espectrofotometria e a atividade semi-quantitativa estabelecida em placas de DNase Test Agar após 48 h de incubação, indicaram uma correlação positiva de 0.699 a um nível de significância de $p=0,01$ (Figura 6).

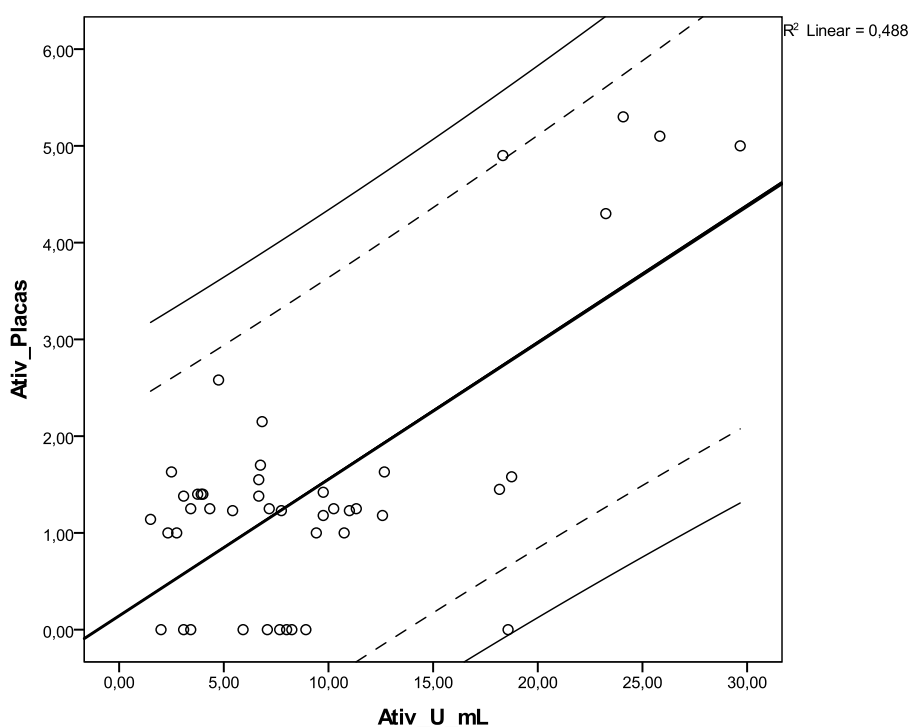


Figura 6. Relação entre a atividade quantitativa (espectrofotométrica - U/mL/min) e atividade semi-quantitativa (placas de *DNase Test Agar*). Linhas tracejadas e normais paralelas à regressão indicam intervalo de confiança de 95 e 99%, respectivamente.

Para esta análise quatro isolados (IBAer001, IBAer007, IBAer016 e IBAer107) foram excluídos em virtude de apresentar uma elevada atividade quantitativa e reduzida ou fraca atividade em placas mesmo após 48 h de incubação. Este fato pode estar relacionado aos diferentes condições de incubação e cultivo inerentes a cada sistema de

avaliação. Além disso, em sistemas sólidos a área de superfície de contato entre o meio de cultivo e a célula bacteriana é menor em comparação a sistemas líquidos, podendo refletir em uma menor eficiência na secreção destas enzimas para o meio extracelular, dificultando sua detecção em meio sólido. Por fim, análise comparativa entre a atividade avaliada nos zimogramas e a atividade semi-quantitativa estabelecida em placas de DNase Test Agar após 48h de incubação indicaram uma correlação positiva de 0.630 a um nível de significância de $p=0,01$ (Figura 7). Da mesma forma que anteriormente, dois isolados (IBAer015 e IBAer016) foram excluídos da análise em virtude de apresentarem uma elevada atividade em géis de zimograma e nenhuma atividade detectada em placas de DNase Test Agar, mesmo após 48h de incubação. Este fato pode estar relacionado a uma produção e secreção diferencial destas enzimas em virtude das condições de cultivo distintas empregadas neste sistema de avaliação.

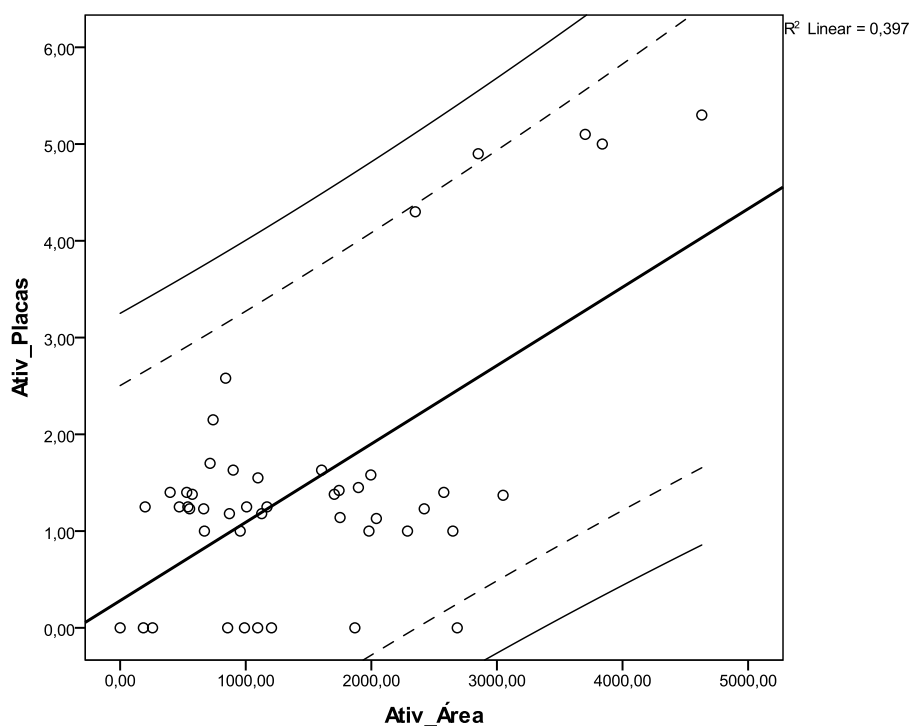


Figura 7. Relação entre a atividade semi-quantitativa (placas de *DNase Test Agar*) e o somatório das áreas (pixel) das bandas (zimogramas). Linhas tracejadas e normais paralelas a regressão indicam intervalo de confiança de 95 e 99%, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos referentes às correlações estabelecidas entre os sistemas de detecção e avaliação de DNases pode-se constatar uma elevada congruência entre os métodos empregados neste estudo indicando que ambos os testes apresentam um bom desempenho na avaliação de DNases extracelulares em *Aeromonas*.

5.4 Estabilidade térmica de DNases extracelular empregando zimogramas

Para esta avaliação quatro isolados correspondendo a *A. sobria* IBAer010 (IOC), *A. hydrophila* IBAer012 (ATCC7966), e a duas *A. hydrophila* IBAer112 e 119, foram selecionados com base em seu diferentes perfis de DNases.

A avaliação realizada para o isolado IBAer010 permitiu a identificação de quatro DNases com massas moleculares aparentes de 22, 32, 85 e 103 KDa, confirmando os resultados obtidos anteriormente (Figura 8).

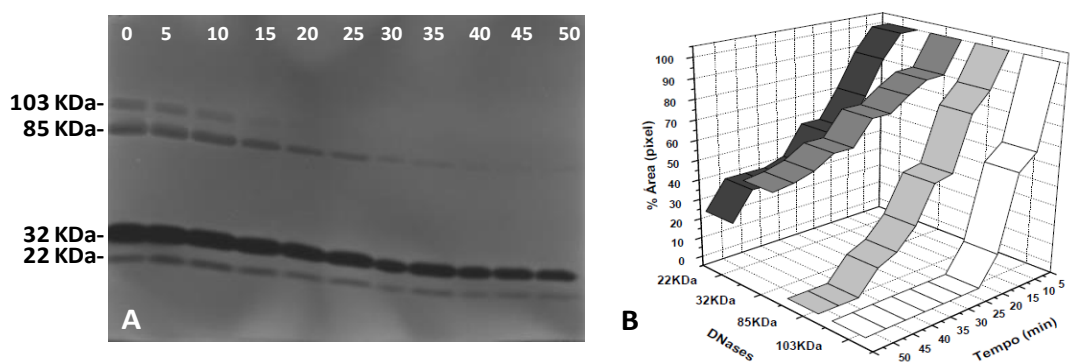


Figura 8. Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer010 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer010 (B).

A maior estabilidade térmica foi observada para a DNase de aproximadamente 32 KDa a qual apresentou uma atividade remanescente de 49,04%, mesmo após 50 minutos de tratamento térmico a 100°C. A segunda maior estabilidade térmica foi observada para a DNase descrita como Dns e com massa molecular aparente de 22

KDa. Esta DNase apresentou uma atividade remanescente correspondente a 25,13% após 50 min. de incubação a 100°C. Já para as DNases de 85 e 103 KDa foi possível observar uma perda total em sua atividade após 35 e 15 min. de incubação a 100°C, respectivamente (Figura 8).

Para o isolado IBAer012, três DNases com massa molecular de aproximadamente 22, 85 e 103 KDa foram identificadas. A maior termoestabilidade foi observada para a DNase com tamanho molecular aparente de 22 KDa a qual apresentou uma atividade remanescente de 58,91% mesmo após 50 min. de incubação a 100°C.

A DNase de 85 KDa também apresentou atividade remanescente após 50 min. de tratamento térmico, no entanto, sua atividade remanescente foi menor (15,86%) em relação à atividade original. Já a DNase com massa molecular aparente de 103 KDa apresentou uma perda total em sua atividade após 30 min. de tratamento térmico a 100°C (Figura 9).

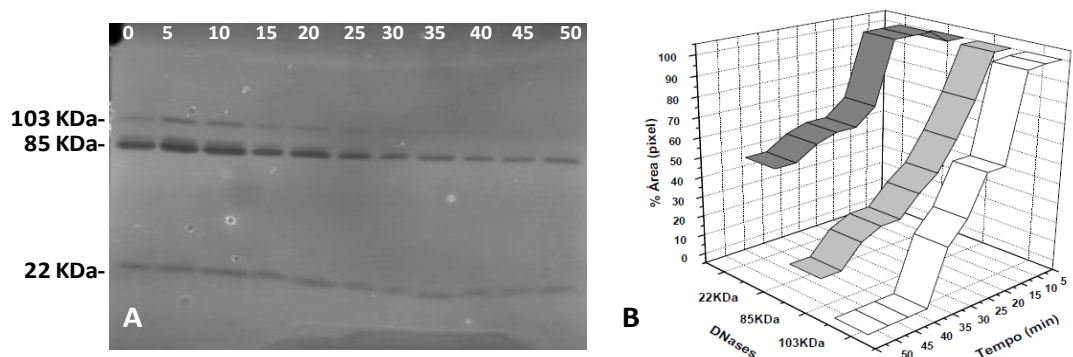


Figura 9. Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer012 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer012 (B).

Para o isolado IBAer112, a maior atividade DNásica remanescente (38,67%) foi observada para a enzima com massa molecular aparente de 22 KDa designada como Dns, sendo esta elevada atividade DNásica observada após 50 minutos de tratamento

térmico a 100°C. A segunda maior atividade DNásica remanescente (26,01%) foi observada para a DNase com massa molecular de aproximadamente 85 KDa, a qual também foi constatada após 50 min. de tratamento térmico a 100°C. As demais DNases designadas como Nuc, com massas moleculares aparentes de 103 e 119 KDa apresentaram uma perda total de atividade após 35 min. de incubação (Figura 10).

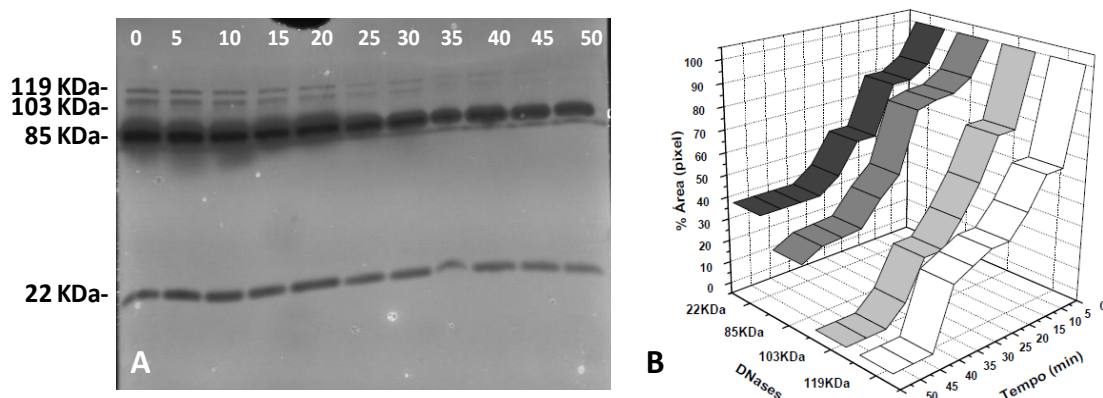


Figura 10. Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer112 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C do extrato extracelular de IBAer112 (B).

Por fim, avaliações envolvendo o isolado IBAer119 permitiram identificar um total de quatro DNases com massa molecular aparentes de 22, 32, 85 e 103 KDa. As maiores atividade DNásicas remanescentes foram observadas para as DNases com massa molecular de 22 e 32 KDa as quais apresentaram valores correspondentes a 75,14% e 64,17%, em comparação a atividade original, mesmo após 50 min. de tratamento térmico, respectivamente. A DNase com tamanho molecular de aproximadamente 85 KDa, também apresentou uma considerável atividade remanescente com valor de 26,01%, após 50 min. de incubação a 100°C. Já a DNase com massa molecular aparente de 103 KDa (Nuc), apresentou uma perda total de atividade após 45 minutos de tratamento térmico (Figura 11).

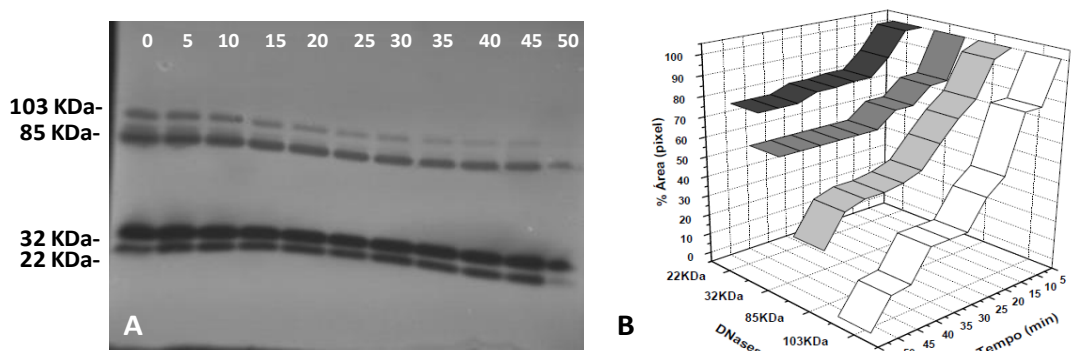


Figura 11. Perfil de zimograma em relação aos diferentes tempos de tratamento térmico a 100°C em extratos extracelulares de IBAer119 (A). Gráfico representando o percentual de atividade remanescente de cada DNase após o tratamento térmico a 100°C em extratos extracelulares de IBAer119 (B).

De acordo com os resultados obtidos, diferentes níveis de termo estabilidade foram observados para cada DNase detectada nos diferentes isolados avaliados. Considerando a DNase com massa molecular de 22 KDa designada como Dns, foi possível constatar atividades DNásicas remanescentes em todos os isolados avaliados mesmo após 50 min. de tratamento térmico. Trabalhos realizados por Chang *et al.* (1992), Dodd & Pemberton (1999) e Nam *et al.* (2004) relativos à clonagem, expressão e caracterização de Dns em *A. hydrophila*, não fazem qualquer menção à termoestabilidade desta enzima em particular. No entanto, cabe ressaltar que a Dns de *A. hydrophila* apresenta elevada homologia (61%) com a DNase vvn de *Vibrio vulnificus*, cuja atividade não foi afetada pelo aquecimento da enzima a 100°C por 30 min. (Wu *et al.*, 2001). Outra DNase que apresentou atividade DNásica remanescente após 50 min. de tratamento térmico foi aquela com massa molecular aparente de 32 KDa, com percentuais variando de 49,04% para o isolado IBAer010 a 64,17% para o isolado IBAer119, demonstrando uma elevada termoestabilidade. Por sua vez, a DNase com massa molecular de aproximadamente 85 KDa apresentou variações em sua termoestabilidade em função do tempo de tratamento térmico e do isolado avaliado. De

um modo geral, esta DNase mostrou-se ativa após tratamento térmico de 50 min. No entanto para os isolados *A. sobria* (IBAer010) esta enzima mostrou atividade até 35 min. de incubação a 100°C, indicando uma menor termoestabilidade desta DNase em comparação à dos isolados de *A. hydrophila* (IBAer012, IBAer112 e IBAer119). Dentre as DNases detectadas e avaliadas, a enzima com massa molecular de aproximadamente 103 KDa foi a que apresentou maior diferença no que se refere à termoestabilidade, mantendo-se ativa por 15 min. em IBAer010, 30 min. em IBAer012, 35 min. em IBAer112 e 50 min. para IBAer119, indicando uma maior capacidade termoestável para representantes de *A. hydrophila* em comparação ao isolado de *A. sobria*.

Considerando o isolado de *A. hydrophila* IBAer112, o qual foi o único a apresentar a DNase de 119 KDa (Nuc), foi possível constatar que esta DNase mostrou-se ativa por até 35 min. de incubação a 100°C, período este, igual a aquele observado para a DNase de 103 KDa identificada no mesmo isolado, indicando similaridade em termos de termoestabilidade para estas DNases.

No trabalho realizado por Dodd & Pemberton (1999) envolvendo a clonagem do gene *nucH* de um isolado de *A. hydrophila* JMP636, o tratamento térmico demonstrou uma redução na atividade de NucH. No entanto, não há dados disponíveis a cerca do tempo de incubação ou da temperatura empregada no experimento tornando difícil a comparação dos resultados.

São muitos os fatores que podem afetar a termoestabilidade enzimática. Dentre estes fatores estão: composição de aminoácidos e suas propriedades intrínsecas, pontes de dissulfeto, interações hidrofóbicas, interações aromáticas, pontes de hidrogênio e pareamento de íons (Vieille & Zeikus, 2001). Este conjunto de fatores pode explicar as variações no que diz respeito à termoestabilidade das DNases avaliadas neste estudo.

De acordo com os resultados obtidos, podemos constatar que *Aeromonas* é capaz

de produzir e secretar DNases com atividade termoestável, fato este reportado também em outras bactérias não termofílicas como *Salmonella* spp (Gibson & McKee, 1993), *Yersinia enterocolitica* (Nakajima *et al.*, 1994), *Serratia marcescens* (Ball *et al.* 1987), *Staphylococcus aureus* (Tang *et al.* 2008), entre outras.

Em termos evolutivos, a presença de nucleases extracelulares termoestáveis pode representar uma vantagem no que se refere a adaptação e estabelecimento em ambientes susceptíveis a variações ambientais, atuando como enzimas relacionadas a aquisição de nutrientes, ou mesmo, como enzimas relacionadas a proteção quanto a entrada de material genético exógeno. Além disso, nucleases extracelulares podem participar na formação de biofilme, influenciando na formação de sua arquitetura, e ainda, podem estar associadas a redução da fagocitose devido a capacidade aumentada de driblar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (Berends *et al.* 2010; Seper *et al.* 2011; Beenken *et al.* 2012; Heun *et al.* 2012).

Em termos de aplicação biotecnológica, enzimas termofílicas são empregadas em bioprocessos fundamentalmente por apresentar a possibilidade de se prolongar o tempo de armazenamento, apresentar maior tolerância a solventes orgânicos, por diminuir o risco de contaminação e por apresentar reduzidas perdas de atividade ao longo do processo, mesmo em temperaturas elevadas frequentemente utilizadas no pré-tratamento de matérias primas (Kristjansson, 1989; Turner *et al.* 2007).

5.5 Curva de crescimento e quantificação da atividade DNásica extracelular de *A. hydrophila* IBAer119

Levando em consideração as diferentes nucleases e as elevadas atividades observadas, o isolado de *A. hydrophila* IBAer119 foi selecionado e submetido à análise quantitativa da atividade DNásica extracelular em relação ao tempo de crescimento. A

avaliação da curva de crescimento permitiu observar um aumento da atividade DNásica extracelular condizente com o aumento da densidade celular. Além disso, é possível observar que as maiores atividades foram detectadas entre 14 e 20h de crescimento, seguidas por uma considerável perda na atividade DNásica extracelular nos tempos subsequentes (Figura 12).

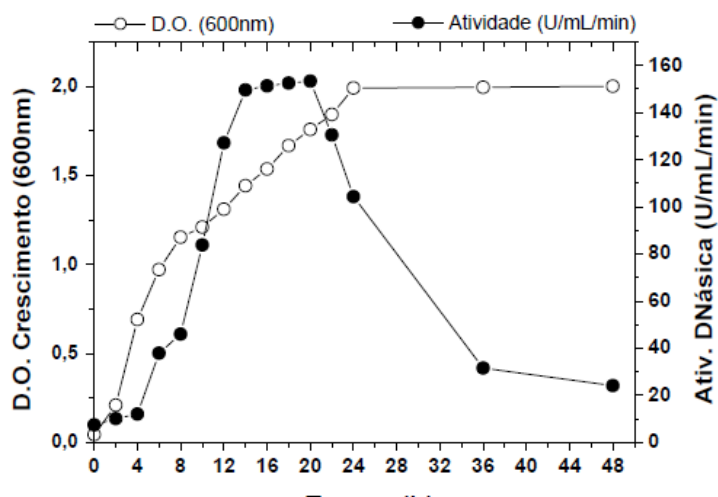


Figura 12. Curva de crescimento e atividade DNásica extracelular em *A. hydrophila* IBAer119.

Como visto anteriormente, o isolado IBAer119 é capaz de secretar um conjunto de DNases extracelular. Com o intuito de avaliar diferenças no que se refere à produção ou secreção destas DNases a longo do tempo de incubação, os extratos extracelular foram submetidos, também a uma avaliação empregando zimograma utilizando DNA de esperma de salmão como substrato, e as áreas de atividade correspondentes a cada DNase foram estimadas com base na área de degradação observada nos géis (Figura 13).

Com base nos resultados obtidos podemos observar que a DNase com massa molecular de 103 KDa foi à enzima que apresentou produção ou secreção mais tardia em comparação as demais DNases. Esta DNase foi detectada em zimograma a partir de 16h de crescimento e apresentando o máximo de atividade no tempo de 18h. Além

disso, após 18h de crescimento observou-se uma consistente queda na atividade desta enzima (Figura 13 A).

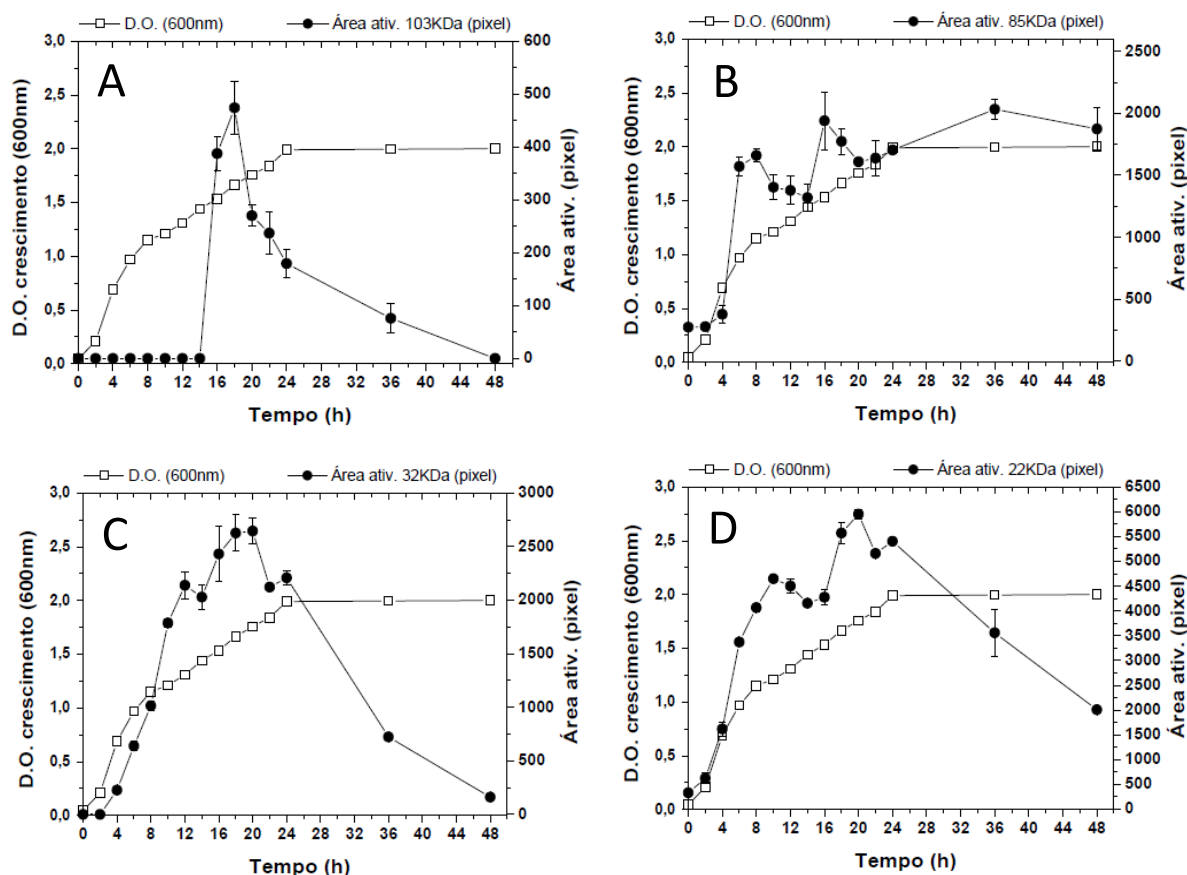


Figura 13. Curva de crescimento em relação à atividade extracelular (área-zimograma). (A) DNase de 103 KDa (nuc); (B) DNase de 85 KDa (aha); (C) DNase de 32 KDa (desconhecida) e (D) DNase de 22 KDa (dns).

Para a DNase de massa molecular aparente de 85 KDa, atividade DNásica extracelular foi detectada desde início do crescimento com picos de máxima atividade nos tempo de 16, 36 e 48h de crescimento. Um fato importante a ser considerado é que esta DNase em particular não apresentou perda considerável em sua atividade mesmo após 48h de crescimento (Figura 13 B). Já para a DNase com massa molecular de 32 KDa, a atividade DNásica extracelular foi detectada a partir de 6h de crescimento com um máximo de atividade entre 18 e 20h. Além disso, para esta DNase foi possível

observar uma consistente redução na atividade após 24h de cultivo (Figura 13 C).

Por fim, a DNase com massa molecular estimada de 22 KDa, assim como a DNase de 85 KDa, apresentou atividade DNásica extracelular desde o início do cultivo. O máximo de atividade foi detectado com 20h de crescimento, sendo registrado um decréscimo na atividade após 24h de cultivo (Figura 13 D).

Dentre as quatro DNases observadas, apenas a DNase com massa molecular aparente de 103 KDa apresentou um padrão de expressão característico de regulação por “*quorum sensing*”. Um trabalho realizado por Chu *et al.* (2013), relacionando a produção de AHL (*N-acyl-homoserine lactone*) com diversos fatores de virulência, entre eles nucleases, indicou que 87,5% dos isolados produziram dois tipos de moléculas sinalizadoras, sendo elas BHL (*N-butanoyl-homoserine lactone*) e HHL (*N-hexanoyl-homoserine lactone*). Segundo os autores, os isolados capazes de sintetizar estas moléculas, apresentaram mais de um fator de virulência, incluindo nucleases. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não evidenciam de forma clara o efeito das AHL sobre as nucleases em particular. Desta forma, estudos específicos necessitam ser realizados para confirmar a hipótese de que AHL são capazes de regular a produção destas enzimas.

Outro fato observado em nosso estudo foi que as DNases de 22 e 85 KDa, apresentam atividade detectada em zimogramas a partir do início do cultivo. Este resultado pode ser explicado pelo fato destas duas DNases estarem presente no espaço periplasmático sendo liberadas gradualmente para o meio extracelular (Figura 14). Sendo assim as atividades detectadas, podem ser atribuídas ao acúmulo periplasmático destas enzimas nas células provenientes do pré-inóculo.

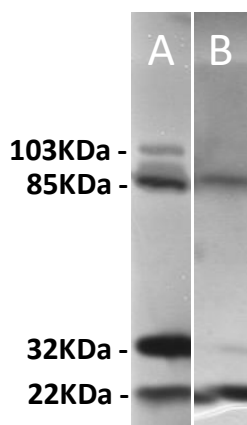


Figura 14. Zimograma representando a atividade DNásica extracelular (A), e periplasmática (B), em IBAer119, após 20 h de crescimento.

Os resultados observados indicam ainda uma consistente queda na atividade DNásica extracelular após 24 h de cultivo. Dentre as quatro DNases observadas apenas a com massa molecular estimada em 85 KDa, não apresentou uma redução considerável em sua atividade.

Diante dos resultados obtidos, passamos a avaliar o nível de expressão gênica em função do tempo de cultivo, nas DNases conhecidas (*dns*, *aha* e *nuc*), empregando PCR em tempo real. De um modo geral, dentre os três genes avaliados, a maior expressão foi observada para o gene *dns* (Figura 15 D), seguido por uma expressão intermediária do gene *aha* (Figura 15 C) e por uma menor expressão do gene *nuc* (Figura 15 B).

A avaliação em particular do gene *dns* permitiu constatar um aumento progressivo em sua expressão entre 2 h e 6 h com valores 3,09 e 4,10 vezes superiores em relação ao controle em tempo zero. A maior taxa de expressão foi observada com 12 h de crescimento onde o valor foi 56,75 vezes superior em relação ao controle. Nos tempos 24 h e 48 h, pode-se observar uma redução na expressão de *dns* em relação ao tempo de 12 h de crescimento, no entanto, as taxas de expressão foram 7,76 vezes maiores em relação ao controle para o tempo de 24 h, posteriormente atingindo nível

próximo ao basal (0,50 vezes) no tempo 48 h (Figura 15 D). Já para o gene *aha* um aumento na expressão de 2,0 vezes foi observado a partir de 2 h de crescimento, caindo em seguida cerca de 0,36 vezes no tempo 6 h. A partir de 12 h de crescimento, um aumento considerável na taxa de expressão foi observado, com valor de 11,68 vezes maior em comparação ao controle. Assim como para o gene *dns*, nos tempos subsequentes de 24 h e 48 h pode-se constatar uma redução na expressão de *aha* em relação ao tempo de 12h de crescimento, entretanto, as taxas de expressão foram 4,12 vezes maior em relação ao controle para o tempo de 24 h, posteriormente atingindo nível inferior ao basal (0,85 vezes) no tempo 48h (Figura 15 C).

Para o gene *nuc* a maior taxa de expressão foi detectada após 2 h de crescimento com um valor de 4,31 vezes superior ao controle em tempo zero. Uma redução na expressão em relação ao tempo de 2h de crescimento foi observada com 6h de crescimento, no entanto, o nível de expressão foi de 0,63 vezes maior, em comparação ao controle. Expressões intermediárias foram observadas para o gene *nuc* após 12 h e 24 h de crescimento, com valores de 2,64 e 2,97 vezes maiores em relação ao controle. Nenhuma expressão de *nuc* foi constatada após 48 h de crescimento (Figura 15 B).

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que o gene *nuc* (Figura 15 B) apresenta uma maior taxa de expressão no início da fase log de crescimento, enquanto que os genes *dns* (Figura 15 D) e *aha* (Figura 15 C) apresentam as maiores taxas de expressão em meio à fase log de crescimento (Figura 15 E), coincidindo com o máximo de atividade DNásica extracelular total detectada (Figura 15 A).

Considerando as três DNases avaliadas, foi possível observar que as maiores taxas de expressão correspondem aos genes *dns* e *aha* indicando que estas enzimas são as responsáveis por maior parte da atividade DNásica total detectada ao longo do tempo, confirmando os resultados obtidos anteriormente mediante avaliação dos zimogramas

(Figura 14). Além disso, a maior taxa de expressão de *dns* e de *aha* coincide com a maior atividade DNásica (12 h).

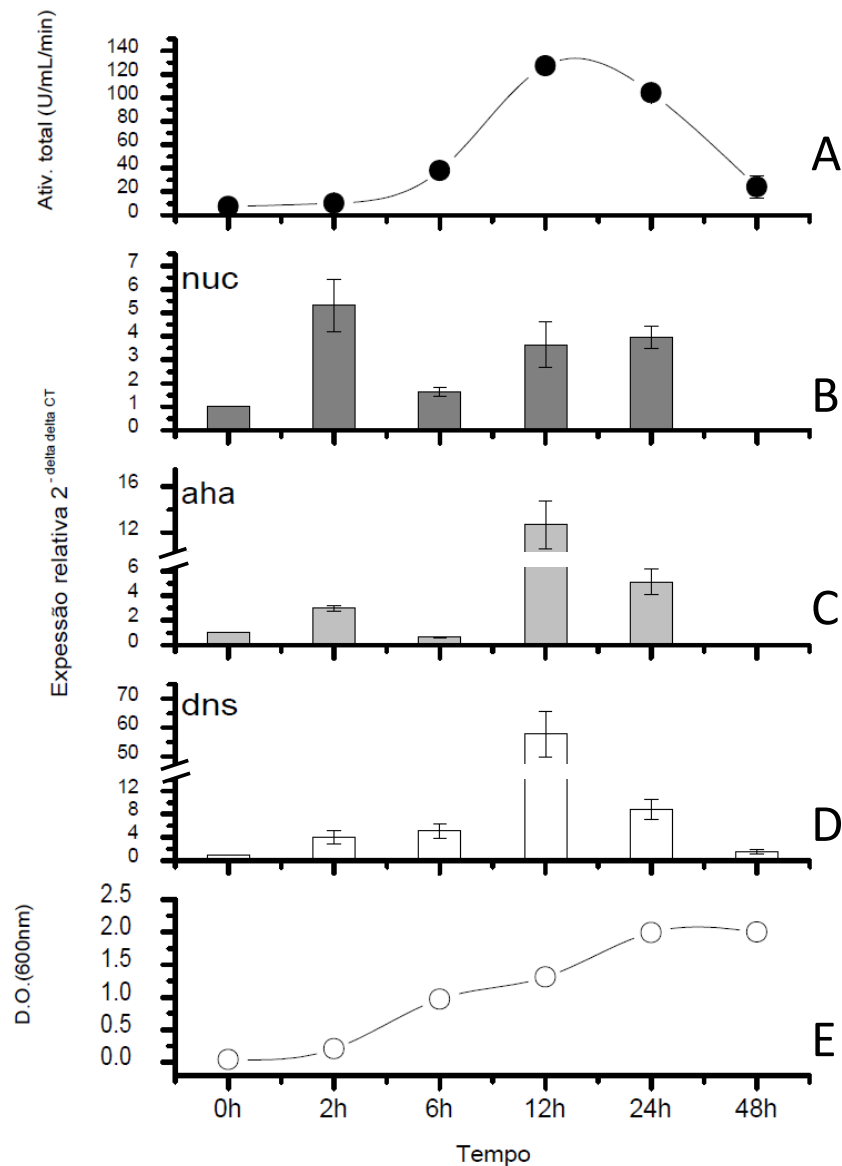


Figura 15. Atividade DNásica total em função do tempo de crescimento (A). Expressão dos genes *nuc* (B), *aha* (C) e *dns* (D), em função do tempo de crescimento. Curva de crescimento de IBAer119 (E).

Levando em conta os níveis de expressão das três DNases avaliadas, e apesar de *dns* e *aha* apresentarem uma redução na taxa de expressão após 12 h de crescimento, as perdas na atividade DNásica extracelular total observada após 24 h de cultivo não são

justificadas por este fato, visto que mesmo após 24h de crescimento, os níveis de expressão para *dns*, *aha* e *nuc* são de 7,76, 5,12, e 2,97 vezes superiores ao controle em tempo zero, levando a crer que a perda de atividade DNásica está relacionada a outros fatores.

É sabido que bactérias do gênero *Aeromonas* são capazes de secretar uma grande variedade de enzimas extracelulares, dentre elas proteases (Pemberton *et al.*, 1997; Zacaria, 2009; Tomás, 2012). Rosenthal & Lacks (1977), avaliando atividade DNásica de extratos produzidos por *Diplococcus pneumonie* demonstraram que a atividade DNásica foi afetada pela ação proteases. Neste sentido, buscamos confirmar a hipótese de que as DNases secretadas por IBAer119 sofrem proteólise, relacionando a atividade DNásica com a atividade proteolítica, empregando azocaseína como substrato, segundo método descrito por Bonato *et al* (1982), em diferentes períodos do cultivo.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar o decréscimo na atividade DNásica extracelular a partir de 18-20 h de cultivo, coincidindo com o aumento na atividade proteolítica extracelular (Figura 16).

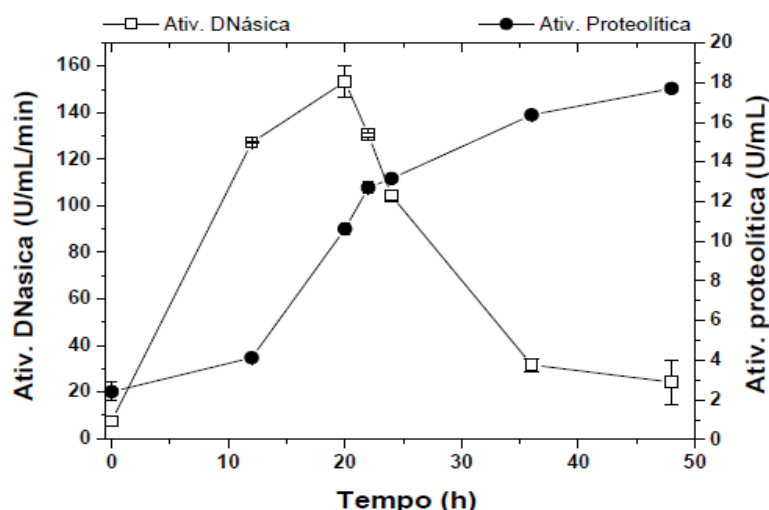


Figura 16. Relação da atividade DNásica extracelular com a atividade proteolítica extracelular em IBAer119.

Os resultados obtidos indicam uma possível ação de proteases sobre as DNases, refletindo desta forma em uma redução da atividade DNásica extracelular após 20-22 h de crescimento. Com base neste resultado, um novo teste foi realizado. Para tanto, alíquotas de extrato extracelular obtido com 20 h de crescimento foram misturadas a alíquotas de extratos extracelulares obtidos com 48 h de crescimento. As proporções de mistura foram 1:0; 1:4; 1:2 e 1:1 (20 h: 48 h). Em seguida, a mistura foi incubada a 37°C por 15 min. e após a atividade DNásica extracelular foi quantificada. De acordo com os resultados observados na Figura 18, pode-se constatar uma redução na atividade DNásica no extrato obtido com 20 h de crescimento em decorrência do aumento da proporção de mistura do extrato com alta atividade proteásica obtido com 48h de crescimento.

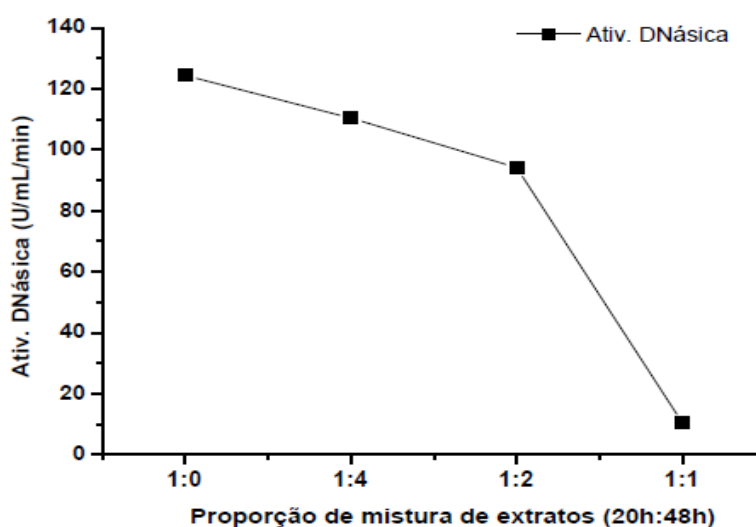


Figura 17. Atividade DNásica do extrato extracelular obtido com 20 h em relação a misturas em diferentes proporções do extrato extracelular obtido com 48 h de cultivo em IBAer119.

De um modo geral pode-se concluir que as DNases são afetadas pela ação de proteases, com exceção da DNase com massa molecular aparente de 85 KDa, a qual se mostrou menos suscetível à degradação proteolítica (Figura 13B). Sendo assim estes resultados são compatíveis com aqueles observados por Rosenthal & Lacks (1977),

tornando evidente o efeito de proteases extracelulares na degradação das DNases secretadas pelo isolado de *A. hydrophila* IBAer119.

5.6 Efeito de DNA como fonte de nitrogênio e fósforo no crescimento e atividade DNásica extracelular de *A. hydrophila* IBAer119

Com o objetivo de investigar a influência de DNA de esperma de salmão como única fonte de nitrogênio e fósforo no crescimento e produção de DNases extracelulares o isolado de *A. hydrophila* IBAer119 foi selecionado com base em seu perfil de nucleases extracelulares. Para isto, a bactéria foi inicialmente crescida em meio LB. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com solução salina 0,9% e mantidas nesta mesma solução por 1 h para proporcionar *starvation*. Em seguida, as células bacterianas foram ajustadas para uma D.O._{600nm} de 0,25 e inoculadas em diferentes meios contendo ou não DNA como única fonte de nitrogênio ou fósforo, sendo seu crescimento e atividade DNásica extracelular monitoradas.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que as maiores taxas de crescimento e produção de DNases extracelulares foram observadas para culturas em meio M9 e meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (Figura 18 A e B).

Crescimento e produção de DNases extracelulares intermediários foram observados para os meios M9 sem fonte de fósforo e M9 sem fósforo acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (Figura 18 C e D). Enquanto que um pequeno crescimento e consequente reduzida atividade DNásica extracelular foram observados para os meios M9 sem fonte de nitrogênio e M9 sem nitrogênio acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (Figura 18 E e F).

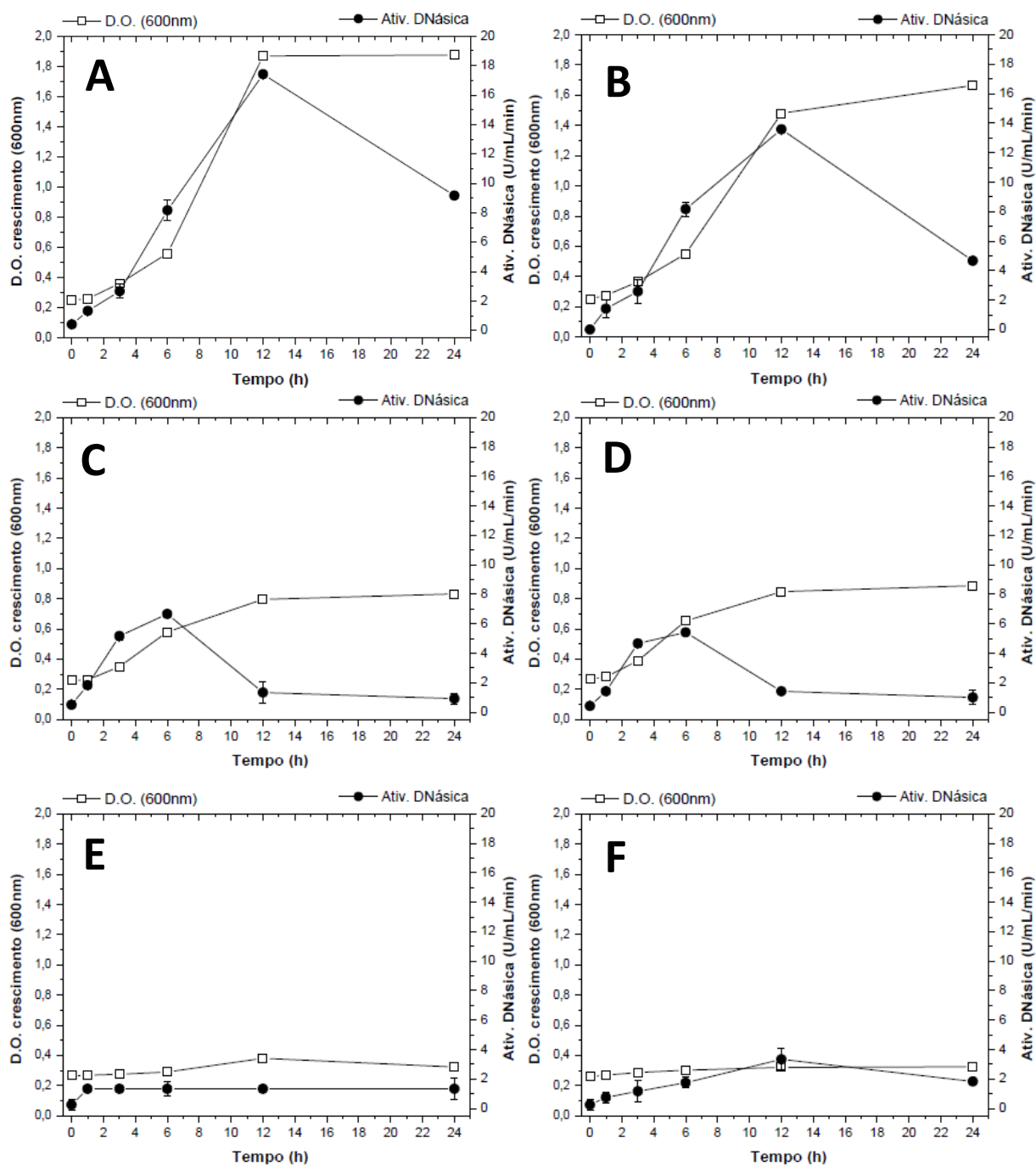


Figura 18. Relação entre o crescimento e a atividade DNásica extracelular em meio M9 (A), M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (B), M9 menos fonte de fósforo (C), M9 menos fósforo acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (D), M9 menos fonte de nitrogênio (E), e M9 menos nitrogênio acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão (F).

O crescimento em meio M9 sem fonte de fósforo foi muito similar a aquele observado em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA de esperma de salmão. Este fato pode estar relacionado à utilização de fósforo intracelular gerado mediante fosforilações e/ou desfosforilações empregadas em processos metabólicos. Já o crescimento em meio M9 sem fonte de nitrogênio e M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA de esperma de salmão foi apenas basal, indicando desta forma que o isolado de *A. hydrophila* IBAer119 não apresenta capacidade de utilizar DNA como fonte nutricional de nitrogênio.

No que diz respeito à atividade DNásica extracelular, quando estas foram normalizadas com base na D.O. de crescimento, nenhuma diferença significativa foi observada entre a atividade detectada em meio M9 e M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão, sendo o máximo de atividade observado entre 6 e 12 h de cultivo. Diferenças significativas foram observadas entre atividades detectadas em meio M9 sem fonte de fósforo e M9 sem fósforo acrescido de DNA, demonstrando uma maior atividade DNásica em meio sem fonte de fósforo acrescido de 10 µg/mL de DNA de esperma de salmão, com pico de atividade entre 3 e 6 h de crescimento (Tabela 13).

Tabela 13. Atividade DNásica ajustadas com base na D.O. de crescimento em diferentes meios de cultivo.

Meio de cultivo	Atividade DNásica (U/mL/min) ajustadas pela D.O. ¹		
	Sem DNA	Com 10µg/mL DNA	Tempo (h)
M9	14,58±1,26 ^A	14,84±0,85 ^A	6-12
M9 sem fonte de Fósforo	14,76±0,67 ^B	16,55±0,83 ^A	3-6
M9 sem fonte de Nitrogênio	4,95±0,87 ^B	10,38±2,20 ^A	1-12

¹ Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

Diferenças significativas também foram observadas entre atividades detectadas em meio M9 sem fonte de nitrogênio e M9 sem nitrogênio acrescido de DNA, demonstrando uma maior atividade DNásica em meio sem fonte de nitrogênio acrescido

de 10µg/mL de DNA de esperma de salmão, com atividades máximas e constantes observadas entre 1 e 12 h de cultivo (Tabela 13).

Com base nos resultados observados, podemos constatar que o DNA não apresenta um claro efeito indutor na produção de DNases extracelulares. Além disso, a queda na atividade extracelular observada em crescimentos empregando M9 e M9 acrescido de DNA pode estar relacionada à degradação das DNases por ação de proteases secretadas por este isolado, fato este, já observado anteriormente.

Apesar do DNA ser considerado uma excelente fonte nutricional de fósforo e nitrogênio, e ter sido demonstrado que algumas bactérias como *E. coli* (Finkel & Kolter, 2001; Palchevsky & Finkel, 2006), *Shewanella* spp (Pinchuk *et al.*, 2008), *P. aeruginosa* (Mulcahy *et al.*, 2010) e *Vibrio cholerae* (Seper *et al.*, 2011), apresentam capacidade de utilizá-lo como fonte de nutriente, em *A. hydrophila* IBAer119 o acréscimo de DNA em meio deficiente em fósforo ou nitrogênio indica que esta bactéria, mesmo produzindo DNases extracelulares, não apresenta capacidade de utilizá-lo como fonte nutricional. Este resultado reforça a ideia de que as DNases produzidas por esta bactéria pode desempenhar um papel associado à patogenicidade ou relacionado à proteção quanto à entrada de DNA exógeno.

Avaliações referentes à expressão dos três genes identificados como DNases (*dns*, *aha* e *nuc*) foram realizadas ao longo de 1, 3, 6 e 12 h de crescimento, nos diferentes meios de cultivo através de PCR em tempo real. A análise comparativa entre os meios de cultivo M9 e M9 acrescido de DNA, permitiram constatar uma expressão basal de *nuc* com 1 h de crescimento, seguida por uma perda de expressão nos tempos subsequentes, em ambos os casos (Figura 19 C e D). Considerando o gene *aha*, uma maior taxa de expressão foi observada em meio M9 acrescido de DNA quando comparado ao meio M9.

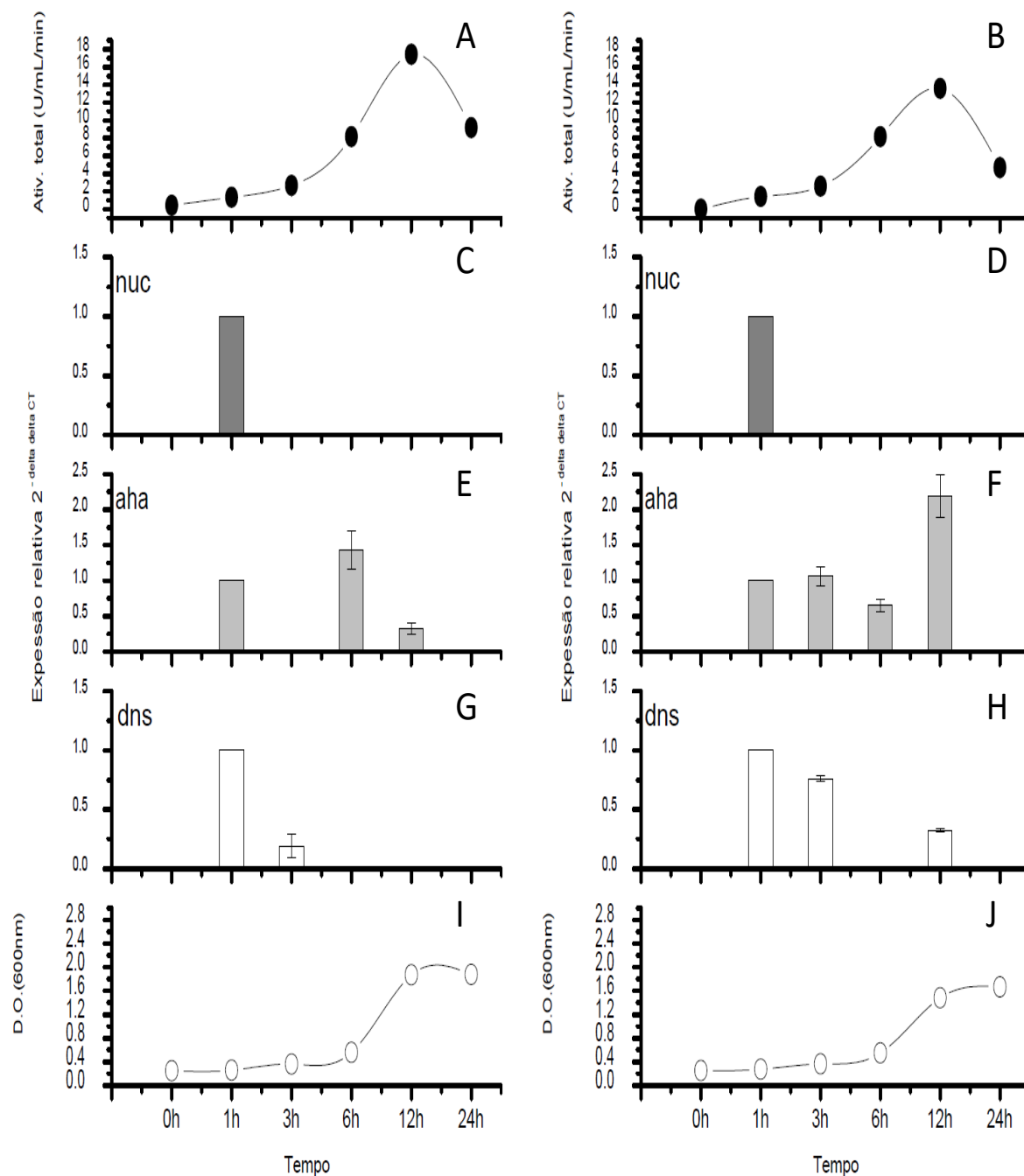


Figura 19. Atividade DNásica extracelular em função do tempo em meio M9 (A), e meio M9 acrescido de DNA (B), Expressão do gene *nuc* em meio M9 (C), e em meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA (D). Expressão do gene *aha* em meio M9 (E), e em meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA (F), Expressão do gene *dns* em meio M9 (G), e em meio M9 acrescido de 10 µg/mL de DNA (H), Crescimento em função do tempo em meio M9 (I), e em meio M9 acrescido 10 µg/mL de DNA (J).

Diferenças relacionadas ao tempo e aos níveis de expressão foram detectadas em ambos os meios. Em meio M9 a maior taxa de expressão do gene *aha* foi observada com 6 h de cultivo com valor 0,43 vezes superior ao controle, enquanto que em meio M9 acrescido de DNA a maior taxa de expressão foi observada no tempo 12 h com um valor de 1,18 vezes superior ao controle (Figura 19 E e F). Já para o gene *dns* uma expressão basal foi constatada com 1h de crescimento, seguida por uma redução na expressão gênica nos tempos subsequentes em ambos os meios (M9 e M9 acrescido de DNA).

A redução mais pronunciada foi observada após 3 h de crescimento em meio M9, com uma taxa de expressão 0,81 vezes inferior ao controle, seguida por uma perda total em sua expressão nos tempos subsequentes. Em meio M9 acrescido de DNA a redução da taxa de expressão após 3h de crescimento foi menos pronunciada, com um valor de 0,25 vezes inferior ao controle, seguida por uma perda total na expressão em tempo 6h e por uma pequena retomada na expressão após 12 h de crescimento (Figura 19 G e H). Apesar de aparentemente os níveis de expressão ser maiores em meio M9 acrescido de DNA quando comparado aos níveis de expressão observados em meio M9, a atividade DNásica extracelular total (Figura 19 A e B) e o crescimento (Figura 19 I e J), mostraram-se muito semelhantes. Considerando que *dns* e *aha* são as responsáveis por maior parte da atividade DNásica extracelular, a semelhança observada entre as atividades detectadas em ambos os meios de cultivo podem ser atribuídas a uma compensação da expressão de *dns* em detrimento a expressão de *aha* verificada em meio M9 acrescido de DNA. Como verificado anteriormente, a redução na atividade DNásica extracelular com 24 h de cultivo em ambos os meios de crescimento, pode ser atribuída à ação de proteases, uma vez que a taxa de expressão em meio M9 acrescido de DNA no tempo de 12 h foi 1,18 vezes superior ao controle.

A avaliação da expressão gênica em meios M9 sem acréscimo de fósforo e M9 sem fósforo acrescido de 10 µg de DNA de esperma de salmão, permitiram identificar uma ampla variação no que se refere à expressão de *dns*, *aha* e *nuc*. Para o gene *nuc*, as maiores expressões foram observadas em M9 acrescido de DNA, com valores 0,19 (3 h) e 19,19 (6 h) vezes superiores em comparação ao controle em tempo 1h (Figura 20 D). Em meio M9 sem fósforo, foi possível observar apenas uma expressão basal com subsequente perda na expressão (Figura 20 C). Em ambos os meios uma perda total na expressão de *nuc* foi observada com 12 h de crescimento (Figura 20 C e D).

Para o gene *aha*, foi possível observar uma taxa de expressão reduzida em ambos os meios de cultivo, com diminuição nos níveis de expressão a partir de 3 h de cultivo, para bactérias crescidas em meio M9 sem fósforo, e a partir de 1 h para bactérias crescidas em M9 sem fósforo com acréscimo de DNA.

Em meio M9 sem fósforo a diminuição dos níveis de expressão de *aha* foi gradual, mantendo o mesmo nível de expressão inicial após 3 h de cultivo, e posteriormente caindo 0,32 e 0,49 vezes em relação ao controle em tempo 1h (Figura 20 E). Já para o meio M9 sem fósforo acrescido de DNA uma diminuição na expressão de 0,16 vezes foi observada após 3h de cultivo, caindo 0,95 vezes em relação ao controle após 6h e chegando a zero com 12h de cultivo (Figura 20 F). Por fim, a avaliação envolvendo o gene *dns* permitiu constatar uma maior expressão em meio M9 sem fósforo acrescido de DNA quando comparado ao meio M9 sem acréscimo de fósforo. Uma expressão de *dns* 0,38 vezes inferior ao controle foi observada com 3 h de crescimento em meio M9 sem fósforo, no entanto, em meio M9 sem fósforo acrescido de DNA um aumento de 3,96 vezes foi observado para o mesmo período de tempo.

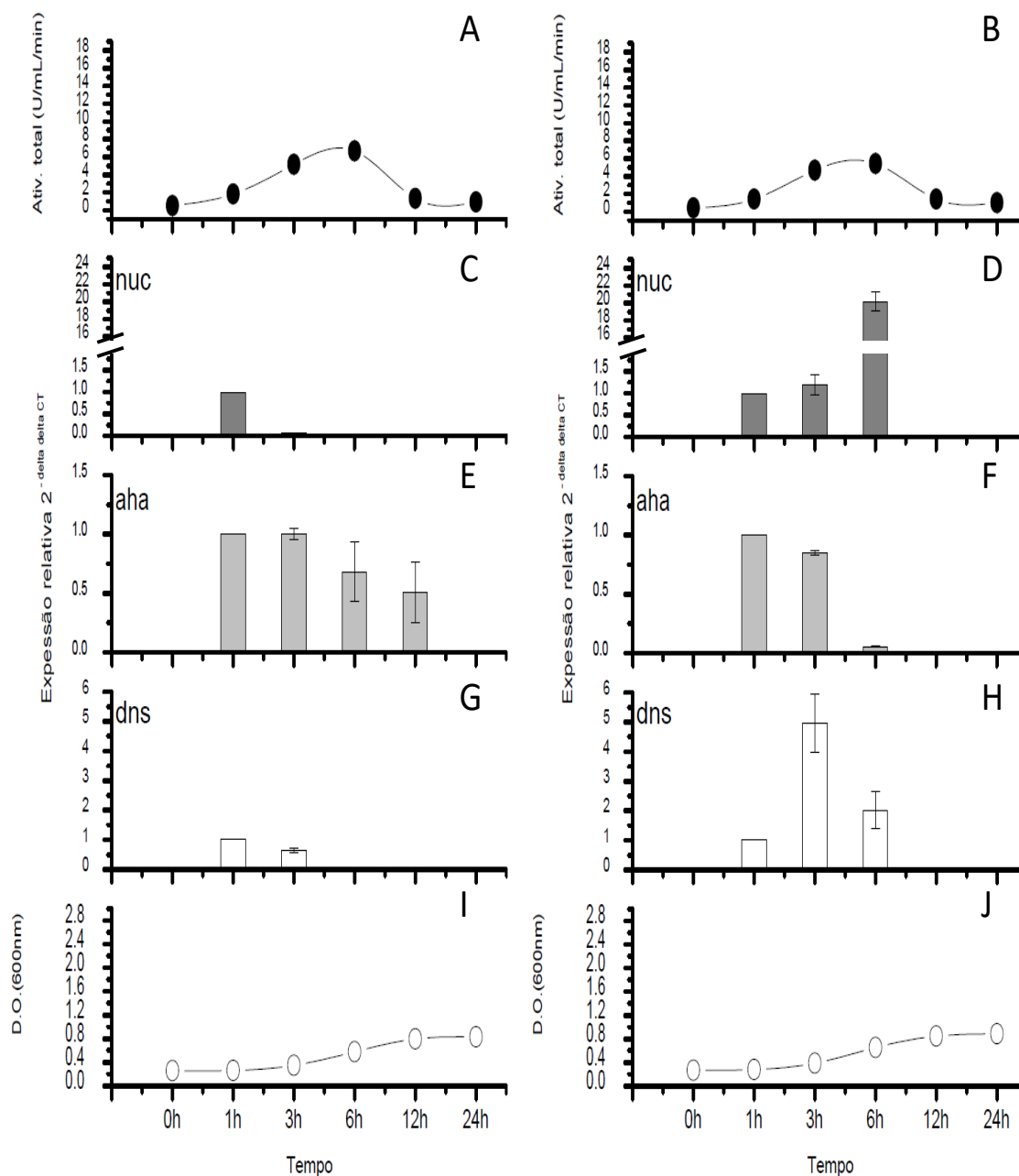


Figura 20. Atividade DNásica extracelular em função do tempo em meio M9 sem fósforo (A), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (B), Expressão do gene *nuc* em meio M9 sem fósforo (C), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (D). Expressão do gene *aha* em meio M9 sem fósforo (E), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (F), Expressão do gene *dns* em meio M9 sem fósforo (G), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (H), Crescimento em função do tempo em meio M9 sem fósforo (I), e em meio M9 sem fósforo acrescido de 10µg/mL de DNA (J).

Outro fato observado foi que nenhuma expressão de *dns* foi constatada em tempos 6 e 12 h para o meio M9 sem fósforo, enquanto que para o meio M9 sem fósforo acrescido de DNA uma taxa de expressão de 1,01 vezes superior ao controle, foi observada com 6 h de cultivo.

Embora diferenças nos níveis de expressão foram observados para *dns*, *aha* e *nuc* entre os meios M9 sem fósforo e M9 sem fósforo acrescido de DNA, a atividade DNásica extracelular (Figura 20 A e B) e o crescimento (Figura 20 I e J), mostraram-se muito semelhantes em ambos os meios de cultivo. Mais uma vez, a expressão aumentada de *dns* em detrimento a *aha* para o meio M9 sem fósforo acrescido de DNA parece compensar a atividade observada para o meio M9 sem fósforo.

A avaliação da expressão gênica em meios M9 sem acréscimo de nitrogênio e M9 sem nitrogênio acrescido de 10 µg de DNA de esperma de salmão permitiram identificar uma maior expressão de *aha* frente aos demais genes *dns* e *nuc* em ambos os meios de cultivo. Para o gene *nuc* uma maior expressão foi observada no tempo 3h com um nível de 1,06 vezes superior ao controle em tempo 1 h, no meio M9 sem nitrogênio acrescido de DNA (Figura 21 D). Em meio M9 sem nitrogênio, considerando o tempo de 3h de cultivo, observou-se uma redução na expressão de *nuc* de 0,20 vezes em relação ao controle em tempo 1 h (Figura 21 C). Em ambos os meios de cultivo, ausência de expressão de *nuc* foi observada após 3 h de crescimento (Figura 21 C e D).

Para o gene *aha* elevados níveis de expressão foram observados em meio M9 sem nitrogênio com taxa de expressão de 14,84, 19,95 e 31,58 vezes superior ao controle (Figura 21 E). Já em meio M9 sem nitrogênio acrescido de DNA uma taxa de expressão 30,32 vezes maior que o controle foi observado após 3h de cultivo, sendo esta reduzida a zero nos tempos subsequentes (Figura 21 F).

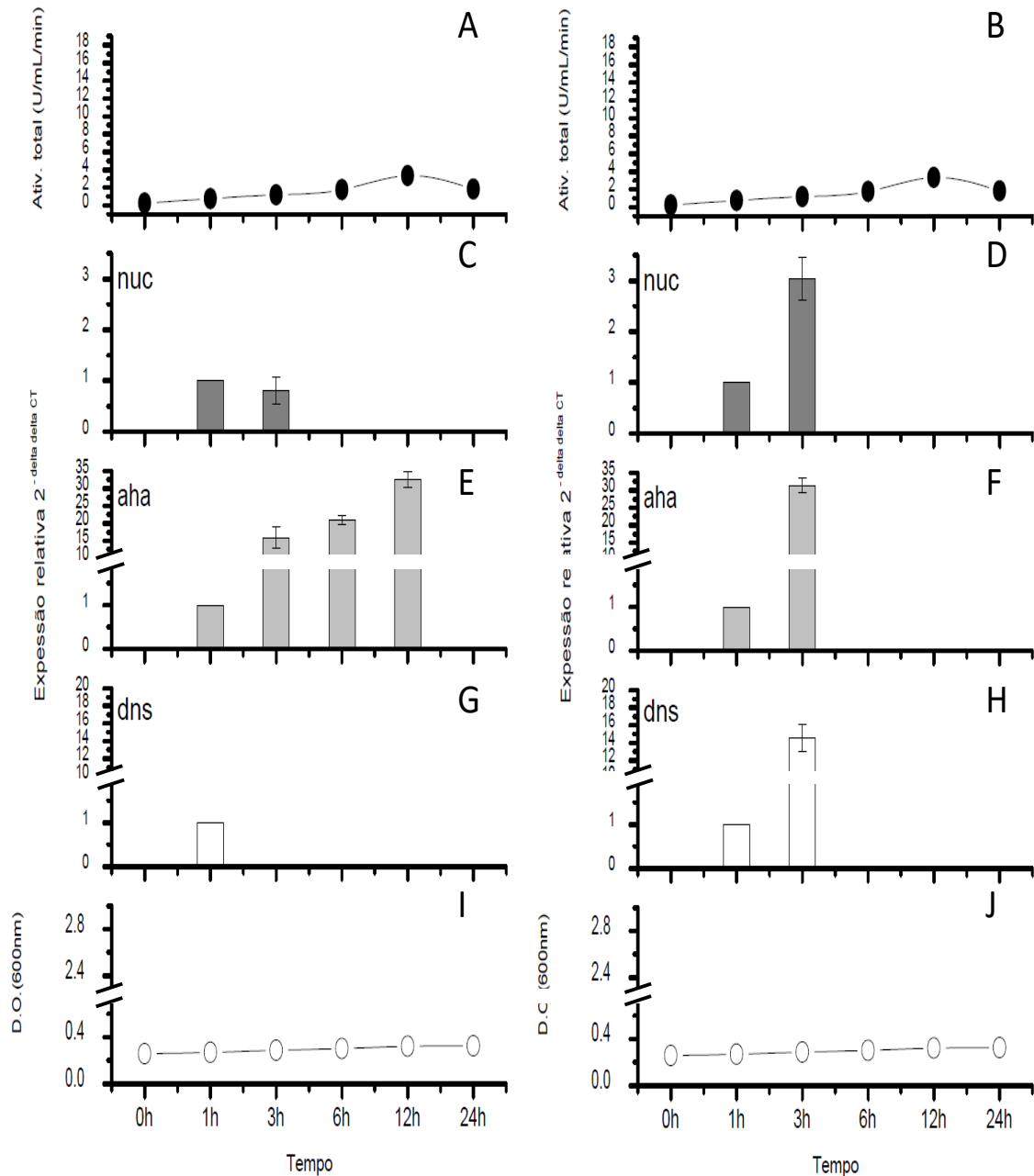


Figura 21. Atividade DNásica extracelular em função do tempo em meio M9 sem nitrogênio (A), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (B), Expressão do gene *nuc* em meio M9 sem nitrogênio (C), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (D). Expressão do gene *aha* em meio M9 sem nitrogênio (E), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (F), Expressão do gene *dns* em meio M9 sem nitrogênio (G), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (H), Crescimento em função do tempo em meio M9 sem nitrogênio (I), e em meio M9 sem nitrogênio acrescido de 10µg/mL de DNA (J).

Para o gene *dns* nenhuma expressão foi observada após 1 h de cultivo em meio M9 sem nitrogênio (Figura 21 G), no entanto, em meio M9 sem nitrogênio acrescido de DNA uma taxa de expressão 13,58 vezes maior que o controle foi observado com 3h de crescimento, caindo para zero nos tempos subsequentes (Figura 21 H). Embora diferenças marcantes tenham sido observadas na expressão de todos os genes avaliados, novamente, as atividades DNásicas extracelulares (Figura 21 A e B) e o crescimento (Figura 21 I e J) mostraram-se semelhantes, sendo apenas basais em ambos os casos.

Poucos trabalhos têm sido realizados objetivando caracterizar a expressão de DNases extracelulares ao longo do crescimento em bactérias. Estes poucos trabalhos restringem-se a estudos realizados em *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens* (Benedik & Strych 1998; Hu *et al.*, 2012). Em *S. aureus* a expressão de suas termo-nucleases estão sob controle de uma complexa rede regulatória durante o ciclo de crescimento, a qual envolve uma série de genes entre eles *agr*, *sae*, *sarA*, e *sigB* (Hu *et al.*, 2012). Já em *S. marcescens* dois sistemas de regulação foram postulados. O primeiro envolve a regulação de *nucA*, por *nucC*, uma proteína pertencente à família P2 Org, correspondente a ativadores transcricionais em fagos. O segundo sinal ambiental conhecido por regular a expressão de nucleases em bactérias é o sistema SOS (Ball *et al.* 1990). Dentre os fatores que podem contribuir de forma direta ou indireta na ativação deste sistema estão danos ao DNA, privação nutricional, mudanças na temperatura e exposição a antibióticos. Este sistema é particularmente ativado a partir do surgimento de DNA de fita simples gerado diretamente por danos ou indiretamente mediante reparo e/ou parada na replicação. O DNA fita simples gerado é reconhecido e ligado por RecA, uma recombinase bacteriana, formando complexos nucleoproteicos. Estes complexos nucleoproteicos, por sua vez, estimulam a auto-clivagem do repressor LexA levando a uma desrepressão de genes SOS, muitos dos quais, codificam para

enzimas que promovem reparo, recombinação e síntese do DNA (Foster, 2007).

Neste estudo, os resultados obtidos principalmente em meio M9 sem fósforo acrescido de DNA e M9 sem nitrogênio acrescido de DNA nos leva a especular que a limitação nutricional leva a uma falha no sistema de replicação e/ou reparo, ativando assim o sistema SOS, o que explica de certa forma o aumento de expressão, em particular, de *dns* e *nuc* em meio M9 sem fósforo acrescido de DNA e de *dns*, *aha* e *nuc* em meio M9 sem nitrogênio acrescido de DNA.

Apesar de verificarmos um aumento na expressão destes genes, reduzidas atividades DNásicas extracelulares foram observadas. Diante deste fato, acreditamos que a limitação nutricional possa ainda levar a bactéria a secretar uma série de “*scouting enzymes*” dentre elas proteases, amilases, fosfatases, DNases, entre outras, na tentativa de assimilar qualquer fonte de nutriente disponível. Como estas enzimas em sua maioria são secretadas por sistemas tipo II ou sec, e este, por sua vez, funcionam mediante necessidade de ATP, uma limitação nutricional poderia levar a uma deficiência na geração de energia, ocasionando assim uma redução na eficiência de secreção destas enzimas para o meio extracelular, explicando desta forma as reduzidas atividades DNásica observadas. Além disso, apesar destas enzimas serem secretadas de forma ineficiente, a quantidade de proteases presentes no meio extracelular poderiam atuar sobre as DNases degradando-as, fato este comprovado anteriormente, explicando assim a queda na atividade DNásica após um determinado período.

Considerando que dentre as DNases conhecidas em IBAer119, *dns* e *aha* são responsáveis por maior parte da atividade DNásica extracelular, a clonagem e expressão heteróloga destes genes foi realizada, assim como sua caracterização.

5.7 Clonagem, expressão heteróloga, caracterização e modelagem proteica das DNases extracelulares Dns e Aha de *A. hydrophila* IBAer119

Alguns genes de DNases extracelulares de linhagens *A. hydrophila* foram clonados. Dentre estes genes estão *nuc* e *dns*, sendo *dns* o com maior número de trabalhos publicados. Um único gene correspondente a *nuc* de *A. hydrophila* foi clonado. Este gene foi clonado da linhagem de *A. hydrophila* JMP636, expresso em *E. coli* JM109, a qual foi capaz de secretar para o meio extracelular uma enzima com massa molecular de aproximadamente 114 KDa. A caracterização desta enzima no que diz respeito à especificidade de substratos, requerimento de cofatores e sensibilidade a agentes desnaturantes foi realizada (Dodd & Pemberton, 1996).

Três genes correspondentes a *dns* de *A. hydrophila* envolvidos na produção de DNases extracelulares foram clonados e expressos. O primeiro deles foi clonado da linhagem CHC-1, e expresso em *E. coli* JM109 a qual, foi capaz de secretar uma enzima com massa molecular de aproximadamente 25 KDa para o meio extracelular (Chang *et al.*, 1992). O segundo gene correspondente a *dns* foi clonado a partir da linhagem de *A. hydrophila* JMP636 e expresso em *E. coli* DH1, no entanto, os autores sugerem que esta enzima apresenta uma localização periplasmática ou associada à membrana, e não extracelular, divergindo do trabalho anteriormente realizado (Dodd & Pemberton, 1999). Por fim, o último trabalho envolvendo a clonagem e expressão de *dns* foi realizada a partir da linhagem de *A. hydrophila* ATCC14715 e expresso em *E. coli* JM105 (Nam *et al.*, 2004). A análise de BLASTp revelou 87% e 85% de homologia com as *dns* clonadas anteriormente. Uma caracterização mais detalhada, porém não completa, foi realizada neste trabalho. Além disso, os autores caracterizaram esta enzima como extracelular corroborando os resultados obtidos por Chang *et al.*, (1992).

Com o intuito de contribuir com mais informações para uma melhor

caracterização desta classe de enzimas, duas DNases correspondentes a Dns e Aha foram clonadas do isolado de *A. hydrophila* IBAer119 e expressas em *E. coli* DH5 α . Nenhum trabalho foi realizado empregando o gene *aha* em *Aeromonas*, tornando este estudo inédito.

5.7.1 Clonagem e expressão do gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119

Para a clonagem do gene *dns*, foi construído um par de *primers* designados como dnsclonF e dnsclonR (item 4.11.1) com base nas sequências nucleotídicas de *Aeromonas* spp. depositada no GenBank. Estes *primers* foram projetados de tal forma a compreender a região codificadora sem seu respectivo promotor, mas com seu terminador traducional tomando o cuidado para manter a correta fase de leitura. Com os *primers* mencionados anteriormente foi amplificado o segmento de 771pb (Figura 22), que foi ligado diretamente no vetor pCRTM2.1 TOPO[®], sendo esta mistura de ligação utilizada para transformar a linhagem *E. coli* DH5 α .

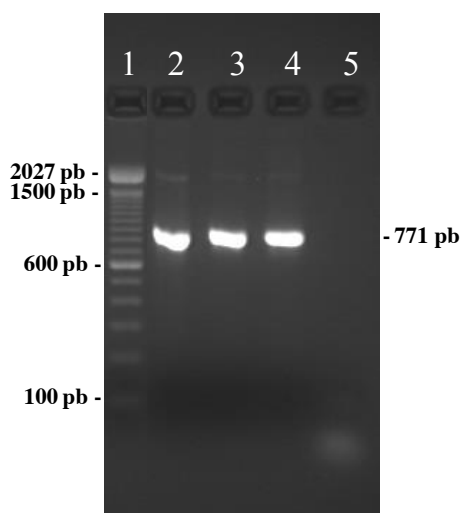


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose (1,5%), correspondente à amplificação do gene *dns* empregado na ligação. Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder* (1), gene *dns* de IBAer119 (2, 3, 4), controle negativo (5).

Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB acrescido de 30 µg/mL de canamicina e a expressão e secreção da nuclease confirmadas em meio *DNase Test Agar* (MERCK), acrescido de 0,01 g/L de Azul de Toluidina e 30 µg/mL de canamicina. Com base na atividade demonstrada em placas de *DNase Test Agar* o clone designado como IBAer119-dnsC5 foi selecionado. O DNA plasmidial de IBAer119-dnsC5 foi extraído empregando Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel®), conforme as recomendações do fabricante. Este transformante apresentou um plasmídeo com aproximadamente 4702 pb onde 3931 pb correspondem ao vetor e 771 pb correspondem ao fragmento amplificado e clonado, contendo o gene *dns*. Um esquema representando o mapa do vetor e do gene clonado pode ser apreciado na Figura 23.

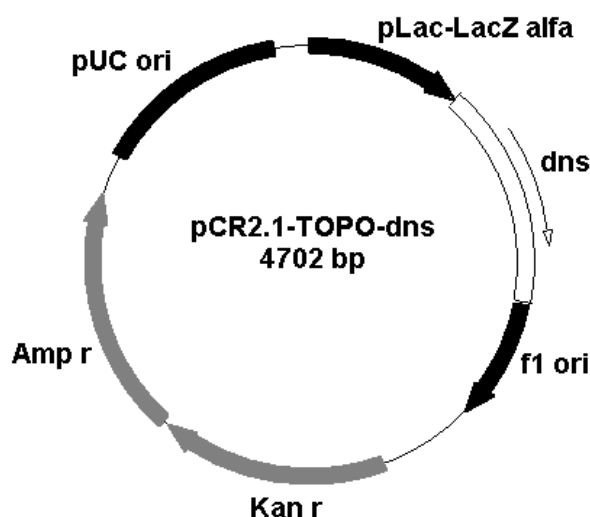


Figura 23. Mapa representando a construção do vetor contendo o gene *dns*.

Com o intuito de confirmar a clonagem do gene *dns*, o DNA plasmidial extraído a partir do transformante IBAer119-dnsC5 foi submetido a um novo PCR empregando os *primers* dns-1F e dns-1R (item 4.11.5). De acordo com o resultado obtido, podemos observar um fragmento com aproximadamente 771 pb, concluindo assim que o fragmento contendo o gene *dns* foi clonado com sucesso (Figura 24).

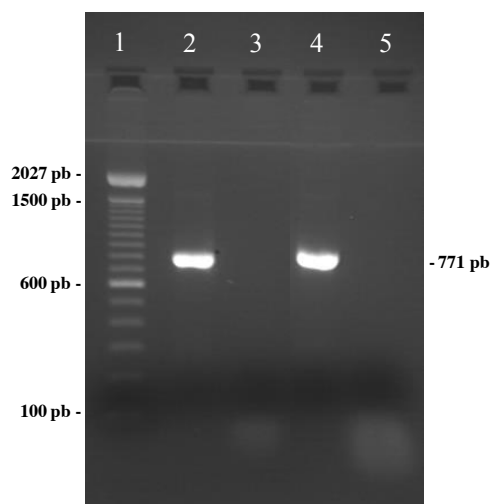


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) para a confirmação da clonagem do gene *dns* em IBAer119-dnsC5. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (1), fragmento correspondente a região codificadora do gene *dns* do transformante IBAer119-dnsC5 (2), DH5 α (3), fragmento correspondente a região codificadora do gene *dns* de IBAer119 (controle positivo) (4), e controle negativo (5).

Além disso, o DNA genômico de IBAer119 e o plasmídeo do transformante IBAer119-dnsC5 contendo o gene *dns*, foram submetidos a um novo PCR empregando os *primers* dns-1F e dns-1R (item 4.11.5), e os fragmentos obtidos foram analisados mediante sequenciamento. De acordo com os resultados obtidos, nenhuma alteração nucleotídica foi observada quando comparados sequenciamentos obtidos a partir de IBAer119 e IBAer119-dnsC5, confirmando mais uma vez a correta clonagem do gene *dns* em *E. coli* DH5 α .

Para determinar a expressão da Dns clonada, a avaliação da relação entre o diâmetro do halo de atividade e o diâmetro do crescimento bacteriano observados em placas de *DNase Test Agar* acrescido de 0,01 g/L de azul de toluidina foi realizada empregando a linhagem receptora DH5 α , a linhagem doadora *A. hydrophila* IBAer119 e o transformante IBAer119-dnsC5 por um período de 24, 48 e 72 h.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 14, nenhuma atividade foi

observada na linhagem receptora DH5 α , enquanto que o transformante apresentou uma atividade DNásica relativa inferior à da linhagem doadora IBAer119. Isto pode estar relacionado ao fato de IBAer119 produzir, além de Dns, outras três DNases, as quais foram detectadas no meio extracelular, explicando assim a diferença encontrada. Além disso, podemos observar que o transformante apresentou atividade DNásica a partir de 24h de incubação, aumentando gradativamente com o passar do tempo, indicando deste modo que *E. coli* DH5 α foi capaz de processar e secretar a enzima Dns clonada.

Tabela 14. Atividade DNásica dos parentais e transformante em placas de *DNase Test Agar*.

Linhagem	Estatus	Atividade DNásica relativa ¹		
		24 h	48 h	72 h
DH5 α	Linhagem receptora <i>E. coli</i>	0,00 $\pm$ 0,00 ^C	0,00 $\pm$ 0,00 ^C	0,00 $\pm$ 0,00 ^C
IBAer119	Linhagem doadora <i>A. hydrophila</i>	2,68 $\pm$ 0,13 ^A	4,28 $\pm$ 0,09 ^A	5,30 $\pm$ 0,05 ^A
IBAer119-dnsC5	Transformante	1,14 $\pm$ 0,05 ^B	2,00 $\pm$ 0,17 ^B	3,11 $\pm$ 0,09 ^B

¹Médias seguidas por letra distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

A análise de crescimento e atividade DNásica extracelular (Figura 25), permitiu verificar que a linhagem receptora de *E. coli* DH5 α apresenta apenas atividade DNásica residual durante o crescimento bacteriano, enquanto, a linhagem doadora IBAer119 exibe um aumento da atividade DNásica extracelular a partir das 4 h, início da fase exponencial, atingindo atividade de 153,33 $\pm$ 6,59 U/mL/min com 20 h, término de fase exponencial e início de fase estacionária. Após 20 h, um decréscimo na atividade DNásica foi observada, coincidindo com a entrada da bactéria em fase estacionária de crescimento. Este decréscimo na atividade DNásica era esperado em virtude da linhagem doadora IBAer119 produzir e secretar proteases capazes de atuar sobre as DNases extracelulares, conforme visto nos resultados anteriormente reportados. Já o

transformante IBAer119-dnsC5 exibiu um aumento na atividade DNásica extracelular a partir das 6 h de cultivo, atingindo o máximo de atividade $173,08 \pm 1,76$ U/mL/min com 24 h de cultivo, permanecendo estável mesmo após 48 h de avaliação.

O fato do transformante IBAer119-dnsC5 apresentar uma atividade superior e constante mesmo após 24 h de cultivo, em comparação a atividade observada para a linhagem doadora IBAer119, pode ser explicada em virtude da linhagem receptora de *E. coli* DH5 α não produzir proteases capazes de afetar a enzima clonada, possibilitando assim, um efeito cumulativo de Dns no meio extracelular.

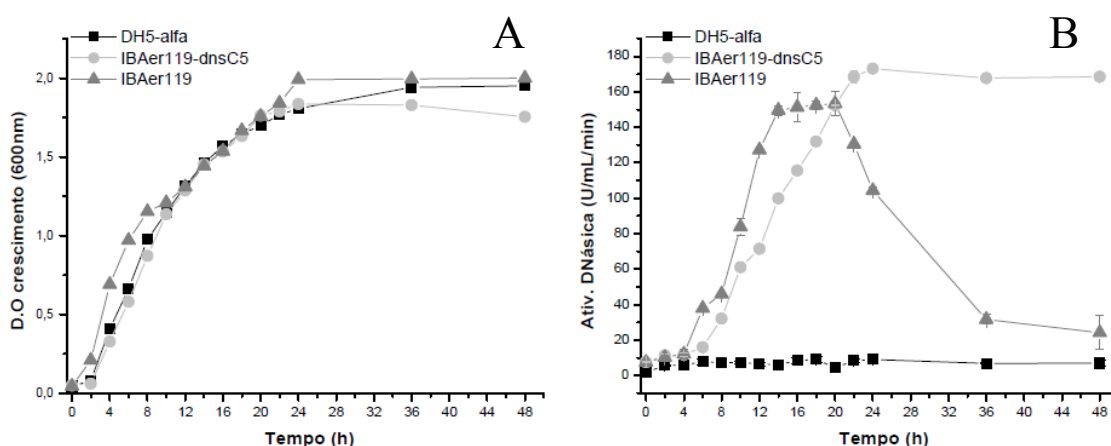


Figura 25. Curva de crescimento (A) e atividade DNásica extracelular (B) das linhagens *A. hydrophila* IBAer119, *E. coli* DH5 α e o transformante IBAer119-dnsC5 em meio LB.

A partir dos dados obtidos, passamos a realizar a caracterização da enzima Dns clonada, empregando o extrato extracelular proveniente do transformante IBAer119-dnsC5. Neste contexto, a DNase Dns foi caracterizada quanto ao efeito de diferentes fatores físicos e químicos que possam afetar sua atividade.

5.7.2 Caracterização da atividade enzimática da DNase recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119.

5.7.2.1 Efeito de cofatores (cátions) na atividade enzimática extracelular da DNase recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes cofatores sobre a atividade DNásica da Dns recombinante, extratos extracelulares proveniente do transformante IBAer119-dnsC5 foram incubados na presença de 5mM de MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 , MnCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 ou FeSO_4 .

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que a Dns recombinante foi ativa mesmo na ausência de adição de qualquer íon metálico com uma atividade de $30,16 \pm 0,23$ U/mL/min. A atividade DNásica foi estimulada pela presença de BaCl_2 , com uma atividade de $64,08 \pm 2,94$ U/mL/min. As maiores atividades DNásicas foram observadas quando MgCl_2 ou MnCl_2 foram adicionados a reação, com valores de $175,16 \pm 3,30$ e $170,75 \pm 1,06$ U/mL/min, respectivamente. Uma pequena redução na atividade foi observada quando CaCl_2 foi adicionado à reação. No entanto, a combinação empregando 5mM de MgCl_2 e 2mM de CaCl_2 não apresentou redução na atividade DNásica apresentando um nível de atividade ($170,83 \pm 0,00$ U/mL/min) bastante similar ao observado quando MgCl_2 foi adicionado de forma isolada. A adição de ZnSO_4 , CuSO_4 ou FeSO_4 provocou uma forte redução na atividade DNásica com valores de $6,33 \pm 1,64$, $3,08 \pm 0,60$ e $7,16 \pm 3,06$ U/mL/min, respectivamente. O gráfico representando as atividades em função dos cofatores empregados na análise esta evidenciado na Figura 26.

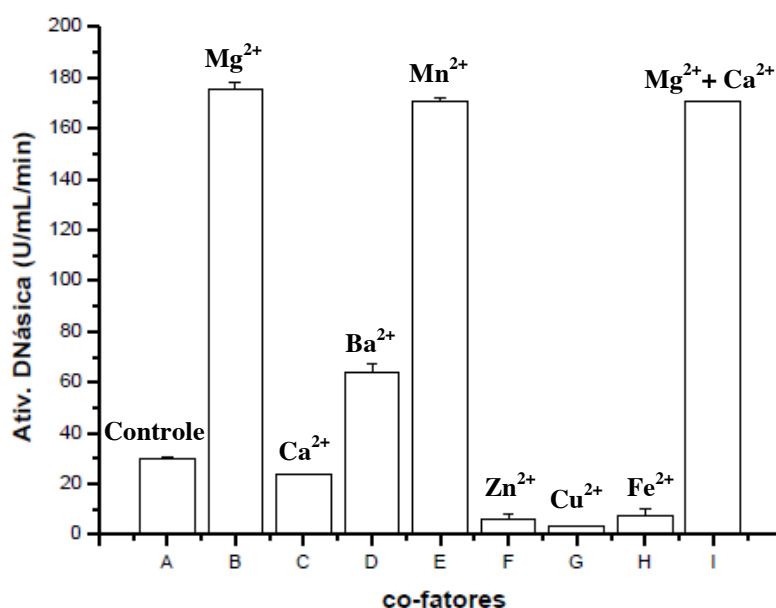


Figura 26. Relação da atividade enzimática da DNase recombinante Dns em função dos diferentes cofatores empregados. 10mM Tris-HCl pH8 (A), acrescido de: 5mM MgCl₂ (B), 5mM CaCl₂ (C), 5mM BaCl₂ (D), 5mM MnCl₂ (E), 5mM ZnSO₄ (F), 5mM CuSO₄ (G), 5mM FeSO₄ (H), e 5mM MgCl₂ + 2mM CaCl₂ (I).

Há muito tempo sabe-se que íons metálicos divalentes são requeridos por DNases para a hidrólise de DNA (Laskowski, 1966). Algumas DNases foram reportadas como requerentes de cátions divalentes para sua plena atividade (Maeda & Taga, 1976a; Maeda & Taga, 1976b; Focareta & Manning, 1987; Meiss *et al.*, 1998). Neste estudo foi possível observar que MgCl₂ e MnCl₂ são importantes cofatores, os quais estimulam a atividade DNásica de Dns. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram aqueles encontrados por Nam *et al.* (2004), onde os autores afirmam que a Dns clonada a partir da linhagem de *A. hydrophila* ATCC14715 é dependente de Mg²⁺ ou Mn²⁺, indicando desta forma que Dns utiliza como cofator ao menos um destes cátions para sua atividade. Além disso, a nuclease Vvn de *Vibrio vulnificus*, a qual apresenta alta homologia com Dns de *A. hydrophila* também requer Mg²⁺ para sua atividade (Wu *et al.*, 2001). Outra nuclease denominada EndA de *Shewanella oneidensis* MR-1, a qual apresenta elevado grau de homologia com Dns

também apresentou um aumento significativo na atividade DNásica quando Mg^{2+} ou Mn^{2+} foram adicionados a reação (Heun *et al.* 2012), apoiando assim os resultados obtidos.

A redução na atividade DNásica observada quando Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} foram adicionados à reação de forma independente, também foi constatada no estudo realizado por Nam *et al.* (2004), sobre a Dns de *A. hydrophila* ATCC14715. No entanto, em nosso estudo, a comparação entre as atividades observadas com adições isoladas destes cátions em relação a atividade observada na adição de 5mM de $MgCl_2$ e 2mM de $CaCl_2$ (concentração padrão utilizada) permitiram constatar uma redução na atividade de 86,1% para solução contendo apenas $CaCl_2$, 96,28% para solução contendo apenas $ZnSO_4$ e 98,24% para solução contendo apenas $CuSO_4$, valores estes superiores a aqueles encontrados por Nam *et al.* (2004), os quais corresponderam a 90% para Zn^{2+} , 77% para Ca^{2+} e 65% para Cu^{2+} . Esta diferença poderia ser atribuída ao tipo de sal utilizado, no entanto, este fato não pode ser comprovado, pois não há qualquer menção a respeito do tipo sais utilizados no trabalho realizado por Nam *et al.* (2004). No estudo realizado por Heun *et al.*, (2012), a nuclease EndA de *Shewanella oneidensis* MR-1 (homologa de Dns) também apresentou uma redução na atividade DNásica quando Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} foram adicionados isoladamente à reação, corroborando desta forma os resultados observados neste trabalho.

5.7.2.2 Efeito de inibidores na atividade enzimática da DNase extracelular recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes inibidores sobre a atividade DNásica da Dns recombinante, extratos extracelulares proveniente do transformante IBAer119-dnsC5 crescido por 24 h a 37°C em meio LB acrescido de 30 µg/mL de Canamicina, foram incubados na presença dos agentes quelantes EDTA, citrato de

sódio, e fosfato de sódio a uma concentração final de 10 mM. O extrato extracelular também foi incubado na presença dos agentes redutores tiol DTT e β -Mercaptoetanol, a uma concentração final de 10 mM. Além disso, o extrato extracelular foi incubado na presença do detergente SDS a uma concentração final de 1%.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que a DNase Dns recombinante mostrou-se ativa mesmo na presença dos agentes redutores tiol, com atividades de $178,91 \pm 0,35$ U/mL/min para extratos contendo DTT e $164,08 \pm 0,35$ U/mL/min para extratos contendo β -Mercaptoetanol, indicando que estes compostos não apresentam efeitos inibitórios significativos sobre a atividade desta DNase. No que se refere aos agentes quelantes à atividade da Dns recombinante mostrou-se pouco afetada na presença de citrato de sódio ou fosfato de sódio, com valores de $144,08 \pm 0,82$ U/mL/min (81,59% da atividade original) e $157,91 \pm 0,35$ U/mL/min (89,42% da atividade original), respectivamente (Figura 27).

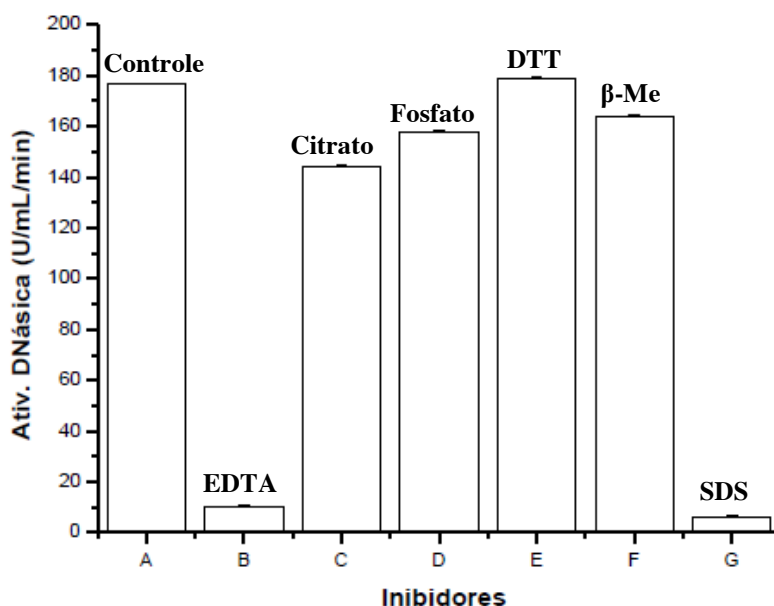


Figura 27. Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns. Controle sem adição de inibidores (A), EDTA 10mM (B), Citrato de sódio 10mM (C), Fosfato de sódio 10mM (D), DTT 10mM (E), β -Mercaptoetanol 10mM (F) e SDS 1% (G).

Por outro lado, Dns foi fortemente inibida quando EDTA foi adicionado à reação, com valores de atividade caindo para $10,25 \pm 0,36$ U/mL/min, correspondendo a apenas 5,80% da atividade original. Dns também foi fortemente inibida quando o detergente SDS foi adicionado à reação, demonstrando uma atividade de apenas $6,33 \pm 0,23$ U/mL/min, correspondendo a uma taxa inibitória de 96,41% (Figura 27).

Algumas DNases foram caracterizadas quanto ao efeito de compostos inibidores sobre a atividade enzimática. Em *Streptococcus suis*, a DNase decodificada pelo gene *ssnA* com um tamanho molecular de aproximadamente 114 KDa foi completamente inibida quando 10 mM de EDTA foram adicionados a reação (Hass *et al.*, 2014). Do mesmo modo, a DNase NucM de *Erwinia chrysanthemi* (homologa a Dns), também foi inibida por EDTA (Moulard *et al.* 1995).

Neste trabalho, 10 mM de EDTA foi capaz de inibir consideravelmente a atividade de Dns. Considerando a capacidade que EDTA apresenta em sequestrar íons divalentes positivos, o resultado obtido é condizente com aqueles encontrados anteriormente onde ficou evidente que Mg^{2+} ou Mn^{2+} são utilizados como cofatores por esta enzima. Desta forma a Dns recombinante clonada a partir de *A. hydrophila* IBAer119 pode ser caracterizada como uma metalo-DNase. Os feitos de citrato de sódio e fosfato de sódio foram menos pronunciados no que diz respeito à inibição de Dns. Apesar de serem considerados agentes quelantes, ambos apresentam maior afinidade por Ca^{2+} (Zittle *et al.* 1956), explicando desta forma seu reduzido efeito inibitório, uma vez que Dns não requer preferencialmente Ca^{2+} para sua atividade.

A nuclease EndA de *Shewanella oneidensis* MR-1 foi rapidamente inibida por 10 mM de DTT (Heun *et al.* 2012). Em *Serratia marcescens* a atividade nucleásica é dependente de pontes dissulfeto (Ball *et al.* 1992), indicando ser afetada por agentes redutores como DTT ou β -Mercaptoetanol. Uma DNase com aproximadamente 24 KDa

clonada a partir de *Vibrio cholerae* quando submetida à eletroforese empregando 5% β -Mercaptoetanol no *sample buffer*, perdeu completamente a atividade, indicando que as pontes dissulfetos presentes estão envolvidas na manutenção da estabilidade da conformação terciária da proteína (Focareta & Manning, 1987). Outra DNase homologa a Dns de *A. hydrophila*, denominada NucM de *Erwinia chrysanthemi*, também foi completamente inibida quando DTT foi adicionado à reação, no entanto, a concentração utilizada foi 10 vezes superior (100 mM) a que utilizamos neste estudo.

A Dns recombinante clonada a partir de uma linhagem de *A. hydrophila*, demonstrou completa perda na atividade quando submetida à eletroforese empregando β -Mercaptoetanol no *sample buffer* (Chang *et al.* 1992), resultado este, idêntico ao observado para a DNase de *Vibrio cholerae* mencionada anteriormente. Embora os resultados obtidos em nosso estudo sejam divergentes no que se refere à inibição por DTT e β -Mercaptoetanol aos observados na maioria dos trabalhos, incluindo aquele realizado por Chang *et al.*, (1992), envolvendo uma Dns de *A. hydrophila*, cabe ressaltar que as avaliações realizadas pela maioria dos autores foram efetuadas sobre a atividade em gel. Além disso, a concentração de DTT ou β -mercaptoetanol foram superiores a aquelas utilizadas neste estudo indicando que 10 mM não são suficientes para afetar a atividade de Dns.

Por sua vez, SDS apresentou um consistente efeito inibitório sobre a atividade de Dns. Este resultado é esperado uma vez que SDS apresenta capacidade de linearizar proteínas modificando a sua estrutura terciária mediante a adição de cargas negativas a proteína (Bhuyan, 2010). No estudo realizado por Moulard *et al.* (1995), a nuclease NucM de *Erwinia chrysanthemi* também foi inibida por 0,1% de SDS, tornando os resultados obtidos neste estudo compatíveis com os observados por estes autores.

5.7.2.3 Efeito do pH na atividade enzimática extracelular da DNase recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119

Para a determinação do pH ótimo de ação de Dns os extratos extracelulares do transformante IBAer119-dnsC5 crescido por 24h a 37°C em meio LB acrescido de 30µg/mL de Canamicina, foram incubados em soluções com pHs variando de 3 a 9, em dois diferentes tampões, a uma concentração final de 20mM. Para pHs entre 3 e 6 utilizou-se tampão citrato, enquanto que, para pHs variando de 7 a 9 utilizou-se tampão Tris-HCl.

Conforme os resultados obtidos, Dns apresenta atividade em pH variando de 8,0 a 9,0, com atividades DNásicas de $157,25 \pm 0,35$ U/mL/min para pH 8,0 e $157,50 \pm 0,23$ U/mL/min para pH 9,0. Em pH 7,0 a atividade de Dns foi levemente inferior a observada em pH 8,0 ou 9,0 com um valor de $139,50 \pm 1,64$ U/mL/min. Em pHs inferiores a 7,0, a atividade DNásicas de Dns foi bastante reduzida (Figura 28).

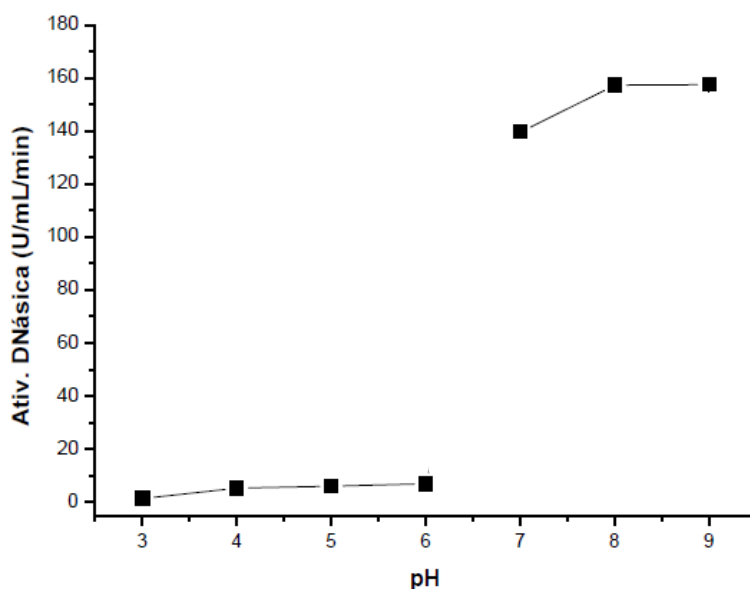


Figura 28. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119.

Alguns trabalhos avaliando o efeito do pH sobre a atividade de DNases foram realizados. NucA de *Anabaena* spp. PCC 7120, apresenta pH ótimo entre 5,5 e 7,5 (Meiss *et al.* 1998). A nuclease Vvn de *Vibrio vulnificus* (homologa a Dns) apresentou um pH de ação variando de 8,0 a 10,0 (Wu *et al.* 2001), valores estes similares a aqueles observados neste estudo empregando Dns. Já as nucleases vsEndA de *Vibrio salmonicida* e vcEndA de *Vibrio cholerae*, também homólogos de Dns, apresentaram pHs de ação entre 8,5 e 9,0 e 7,5 e 8,0, respectivamente (Altermark *et al.* 2006b), corroborando os resultados obtidos em nosso trabalho. A nuclease NucM de *Erwinia chrysanthemi* (homologa a Dns) apresentou mais que 50% de atividade em pHs variando entre 6,5 e 9,0, com pH ótimo entre 7,5 e 8,2 (Moulard *et al.* 1995).

No estudo realizado por Nam *et al.* (2004), no qual a Dns de *A. hydrophila* ATCC14715 foi clonada, o pH de ação encontrado variou entre 6,5 e 7,5. Apesar dos resultados serem compatíveis aos observados em nosso estudo, em nenhum momento os autores mencionam a faixa de pH na qual a enzima foi testada. Além disso, um fato importante a ser considerado é que a Dns de *A. hydrophila* clonada por estes autores foi fundida a uma proteína de ligação a maltose, sendo esta não clivada durante o processo de purificação sugerindo que o sítio de clivagem não se encontra acessível para a ação da protease. Este fato poderia explicar a pequena divergência relacionada ao pH de ação de Dns observada. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que Dns é uma DNase com ação preferencial em pHs alcalinos, caracterizando-a assim como uma DNase alcalina.

5.7.2.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática da DNase extracelular recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119

Para estipular a temperatura ótima de ação de Dns os extratos extracelulares provenientes do transformante IBAer119-dnsC5 crescido por 24 h a 37°C em meio LB

acrescido de 30µg/mL de Canamicina, foram submetidos a análises de atividade DNásica em temperaturas de incubação variando de 20 a 90°C.

Conforme os resultados mostrados na Figura 29, foi possível constatar que a Dns apresentou atividade em todas as temperaturas testadas, no entanto, a melhor temperatura para a atividade desta enzima varia entre 37°C e 60°C, com valores de atividade de 179,08±3,41 U/mL/min a 37°C, 179,75±0,58 U/mL/min a 40°C, 180,66±4,47 U/mL/min a 50°C e 180,58±5,89 U/mL/min a 60°C. Apesar da melhor temperatura para Dns variar entre 37°C e 60°C, elevadas atividades também foram observadas quando esta enzima foi incubada a temperaturas de 30°C e 70°C, com valores de atividade de 141,41±0,82 U/mL/min e 160,33±5,89 U/mL/min, respectivamente.

O estudo empregando DNases homologas a Dns permitiram observar que em *V. salmonicida* a temperatura de ação de vsEndA foi de aproximadamente 45°C, enquanto que para vcEndA de *V. cholerae* a temperatura de ação foi por volta de 50°C (Altermark *et al.* 2006b). Estes valores são condizentes com os resultados obtidos neste estudo.

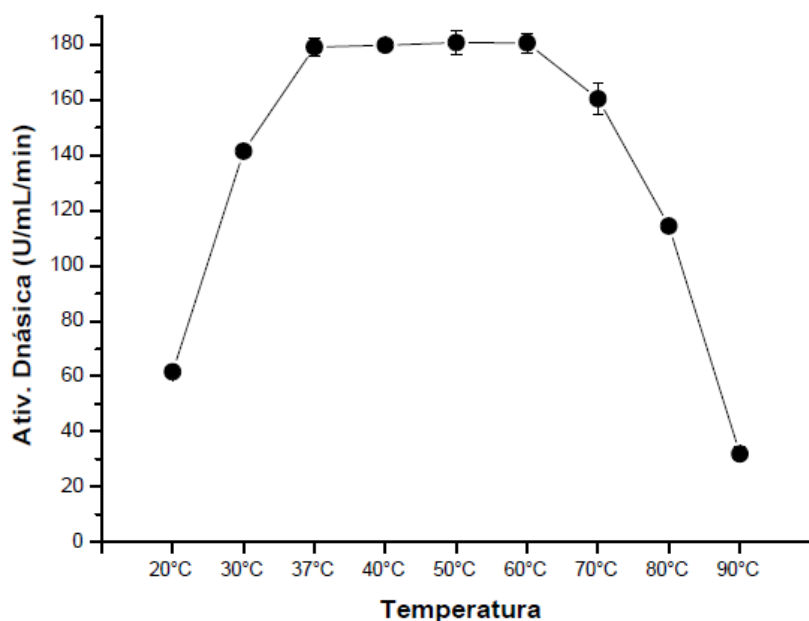


Figura 29. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119.

O único trabalho realizado por Nam *et al.* (2004) caracterizando Dns de *A. hydrophila* indica que a temperatura de ação da enzima é 30°C, no entanto, a Dns estudada esta fundida a uma proteína de ligação a maltose podendo ser atribuído a este fato a divergência observada. Além disso, novamente os autores não mencionam a faixa de temperatura na qual a enzima foi testada tornando difícil a comparação dos resultados.

5.7.2.5 Estabilidade térmica da DNase extracelular recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119

Para avaliar a estabilidade térmica de Dns os extratos extracelulares do transformante IBAer119-dnsC5 crescido por 24h a 37°C em meio LB acrescido de 30µg/mL de Canamicina, foram pré-incubados em temperaturas de 40, 60 e 90°C por tempos variando entre 5 e 60 min (Figura 30).

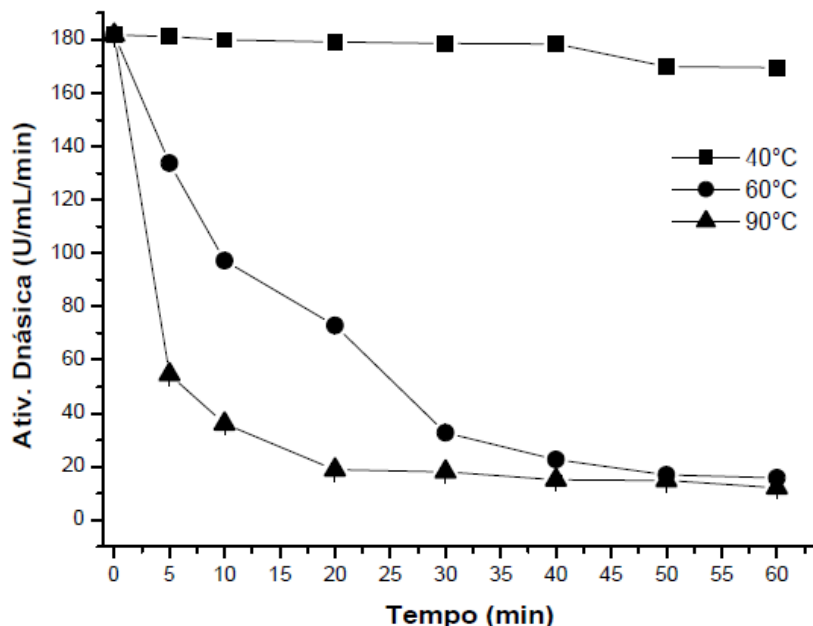


Figura 30. Efeito do pré-tratamento térmico sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Dns de *A. hydrophila* IBAer119.

Os dados obtidos mostram que Dns é estável a temperatura de 40°C, mesmo após 60 min. de pré-tratamento, com valores de atividade variando de 181,75±0,82 U/mL/min sem tratamento térmico a 169,50±0,70 U/mL/min com 60 minutos de tratamento. Já em temperatura de 60°C, Dns apresenta uma gradual perda na atividade, sendo esta mais acentuada nos 30 minutos iniciais de pré-tratamento. Quando Dns foi pré-tratada a temperatura de 90°C, uma rápida redução na atividade DNásicas (69,96%) foi observada logo com 5 minutos de pré-tratamento.

Os resultados neste experimento são de certa forma, conflitantes em relação àqueles observados na análise dos zimogramas (Figura 11), onde Dns apresenta elevada capacidade de degradar o substrato mesmo após 40 min. de tratamento a 100°C. Esta aparente discordância poderia ser explicada em virtude das metodologias de análise empregadas em cada experimento. Para a avaliação dos zimogramas os extratos brutos extracelulares foram tratados termicamente e após submetidos a eletroforese, seguida por um período de incubação de 12 h. Este período de incubação pode favorecer a reestruturação de Dns possibilitando assim a detecção de atividade DNásicas mesmo após o prolongado período de tratamento térmico. No caso dos resultados observados na Figura 31, a avaliação da atividade extracelular quantitativa foi realizada empregando extratos extracelulares brutos mantidos nas temperaturas mencionadas (40, 60 e 90°C) por tempos variando entre zero e 60 min., podendo assim reduzir a capacidade de reestruturação de Dns, levando a uma redução na atividade DNásicas ao longo do tempo.

A nuclease NucM de *E. chrysanthemi* não foi inativada após 15 min. a 70°C, no entanto, ela foi completamente inativada após um tratamento térmico de 90°C por 15 minutos, sendo considerada pelos autores como sendo uma enzima bastante estável (Altermark *et al.* 2006b). Comparando este resultado ao obtido neste trabalho, podemos afirmar que Dns é uma DNase apresenta uma reduzida estabilidade térmica,

considerando que esta enzima se mostrou ativa, mas com uma pequena atividade ($15,83 \pm 0,47$ e $12,08 \pm 1,29$ U/mL/min), quando submetida a 60°C e 90°C por 60 minutos, respectivamente.

5.7.3 Análise de bioinformática *in silico* da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119

5.7.3.1 Análise de bioinformática da sequência nucleotídica e proteica da DNase

Dns de *A. hydrophila* IBAer119

O produto de PCR com tamanho molecular de 771pb, correspondente ao fragmento contendo a ORF (*Open Read Frame*) do gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119, foi clonado no vetor pCR™2.1 TOPO®. A análise da sequência obtida através de sequenciamento permitiu identificar uma ORF de 687 nt (Figura 31).

```

      10      20      30      40      50
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  ATGTTTCGTCCCCTGCTCTCTCTCGCCCTGACCCCTGCTGGTCTGAGTCTGCCC
      60      70      80      90     100
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  CCTGTCATGCCAGACTTTTCGCGCCGCCAAACAGGATCTGAACCGCCTCT
      110     120     130     140     150
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  ATCAGGATCACCCGGTTACCTTCTACTGCGGCTGCAAGATTGACTATCAG
      160     170     180     190     200
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  GGCAAGAAATGAAGCCCGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGCAA
      210     220     230     240     250
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  GCAGCCCAAGCGCGCCCGCCGCATCGAGTGGGAACACGTAGTCCCCGCCT
      260     270     280     290     300
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  GGGAGTTCGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAGCAGGGTGGTCGCAAGAAC
      310     320     330     340     350
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  TGCAGAAAAGCGAGCCCCGAGTTCAATAAGATGGAGGGGGACATGCACAA
      360     370     380     390     400
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  CCTCTTCCCCGCCATCGGCGAAGTGAACGGCGATCGGGCCAACCTCCGCT
      410     420     430     440     450
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  TCTCCGACTGGAATGGCACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGCTG
      460     470     480     490     500
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  GTAGACTTCAAAATCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGGTACGGGG
      510     520     530     540     550
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IBAer119-dnsC5  CCAGATCGCCCGCGCCTACCTCTATATGAGCCAGCAGTATGGGCTGCGTC

```

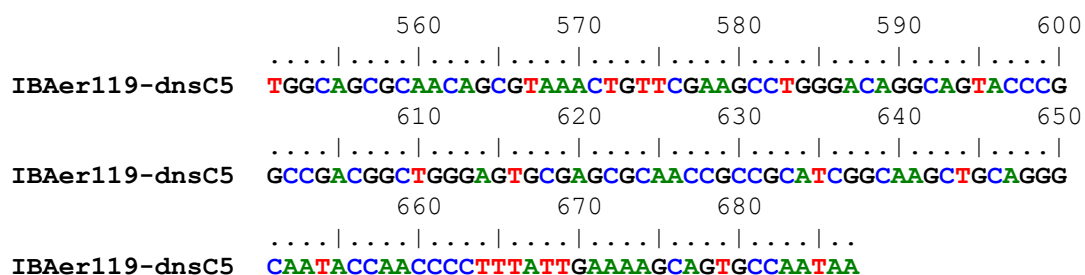


Figura 31. Sequência nucleotídica correspondente à ORF da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 clonada em *E. coli* DH5α. Nucleotídeos adenina (verde), timina (vermelho), citosina (azul) e guanidina (preto).

Com base no resultado do sequenciamento, uma busca por sequências nucleotídicas homologas a ORF da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 foi realizada. Esta busca inicialmente foi restrita a organismos do gênero *Aeromonas* e baseada nos bancos de dados *Nucleotide collection* (nr/nt) e *Whole-genome shotgun contigs* (wgs), disponíveis no NCBI. Os resultados obtidos permitiram identificar diversas espécies de *Aeromonas* as quais apresentaram ORFs com elevado grau de homologia com a ORF da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119. Uma análise de agrupamento empregando o algoritmo *Neighbor-Joining* com um *bootstrap* de 2000 replicatas foi executado com base em representantes do gênero *Aeromonas*.

Conforme pode ser observado na Figura 32, um elevado grau de homologia foi evidenciado entre todas as espécies de *Aeromonas* analisadas. A análise de agrupamento evidencia que a DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta maior semelhança em nível nucleotídico com a maioria das *A. hydrophila* avaliadas, especialmente com relação aos isolados ML09-119, AL09-71, pc104A, J-1, ATCC7966, AL06-06 e ATCC14751.

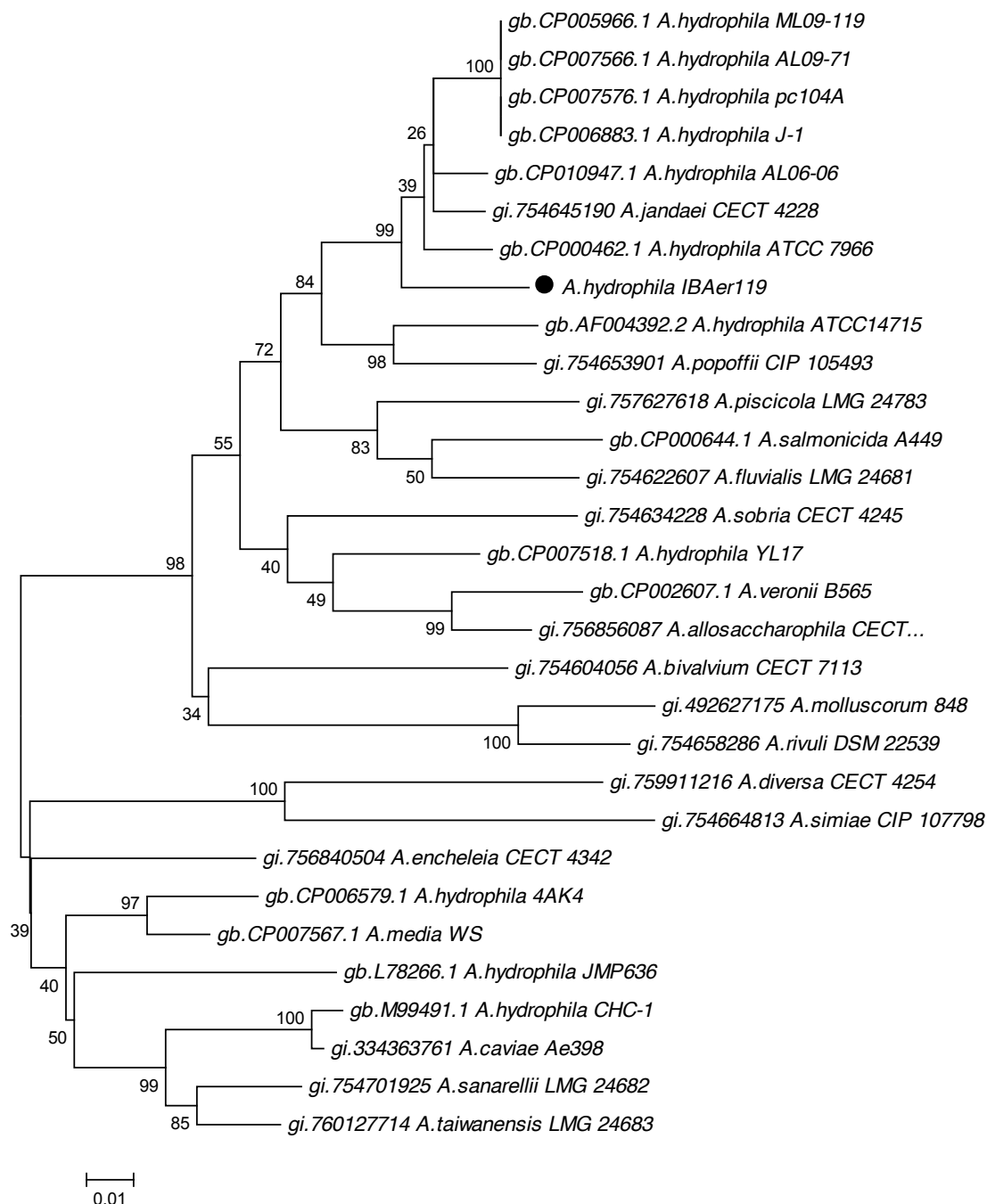


Figura 32. Análise de agrupamento (*Neighbor-Joining*), baseado na sequência nucleotídica de DNases Dns em representantes do gênero *Aeromonas*. Círculo preto (●), indica a posição *A. hydrophila* IBAer119, isolado empregado neste trabalho.

Apesar do elevado grau de similaridade, pequenas diferenças intraespecíficas podem ser observadas particularmente entre os representantes de *A. hydrophila*, uma vez que os isolados desta espécie se encontram distribuídos ao longo dos demais grupos formados. Considerando o elevado grau de similaridade observado entre as diferentes espécies de *Aeromonas* avaliadas, algumas sequências oriundas de genomas completamente sequenciados ou clonadas, excluindo por tanto as sequências provenientes de *shotgun contigs*, foram avaliadas com maiores detalhes.

A análise comparativa de BLASTn empregando a sequência nucleotídica do gene *dns* clonado a partir de *A. hydrophila* IBAer119 em relação às sequências nucleotídicas correspondentes a genes homólogos de *Aeromonas* spp., depositadas no banco de dados *Nucleotide collection* (nr/nt) do NCBI foi realizada. A avaliação permitiu identificar que a ORF de *A. hydrophila* 4AK4 anotada com 644nt e localizada originalmente na posição 1218784-1219427, na verdade apresenta uma ORF de 699 nt e esta localizada na posição 1218784-1219482, com o *start códon* localizados cerca de 55 nt *upstream* a posição anotada originalmente. Para *A. hydrophila* YL17 a ORF anotada com 643 nt, localizada originalmente na posição 761848-762490, na verdade apresenta uma ORF de 702 nt, localizada na posição 761848-762549, com um *start códon* localizado cerca de 59 nt *upstream* a posição anotada originalmente. Já, para *A. veronii* B565 a ORF anotada com 645nt, localizada originalmente na posição 3419991-3420635, na verdade, apresenta uma ORF de 705 nt localizada na posição 3419931-3420635, com um *start códon* localizado cerca de 60 nt *upstream* da posição anotada originalmente. Estes resultados indicam uma possível falha na anotação para este gene em particular nestas linhagens.

Após realizar as correções mencionadas anteriormente, foi possível estabelecer comparações mais precisas no que diz respeito ao tamanho da ORF, % de GC,

identidade e cobertura dos genes *dns* avaliados.

A comparação entre as sequências nucleotídicas do gene *dns* clonado a partir de *A. hydrophila* IBAer119 em relação aos genes *dns* homólogos das espécies de *Aeromonas* analisadas, permitiu constatar um percentual de GC variando entre 58,99 a 63,39%, estando o valor observado para gene *dns* clonado a partir de *A. hydrophila* IBAer119 dentro desta faixa de variação (Tabela 15). Por sua vez, a comparação entre as sequências nucleotídicas do gene *dns* permitiu constatar coberturas variando entre 91 e 100% com identidades variando entre 84 e 95%. A comparação entre os percentuais de GC, tamanhos de ORF corrigidas, cobertura e identidade, do gene *dns* em relação aos demais genes homólogos, clonados ou provenientes de genomas completamente sequenciados são mostrados na tabela 15.

Tabela 15. Comparação entre a composição nucleotídica (GC), cobertura e identidade da ORF do gene *dns* de *Aeromonas*.

Espécies*	ORF**	Composição nucleotídica	Cobertura	Identidade	Referência/Acesso NCBI
		% GC			
Ah- IBAer119	687nt	60,99	-	-	Este estudo
Ah- ATCC14715	684nt	61,26	100%	91%	Nam <i>et al.</i> (2004) ^A
Ah- JMP636	711nt	63,31	91%	86%	Dodd & Pemberton (1999) ^B
Ah- CHC-1	694nt	62,91	100%	84%	Chang <i>et al.</i> (1992) ^C
Ah-4AK4	699nt	63,09	94%	88%	NCBI (CP006579.1)
Ah-AL09-71	684nt	61,70	100%	95%	NCBI (CP007566.1)
Ah-ATCC7966	684nt	61,70	100%	95%	NCBI (CP000462.1)
Ah-ML09-119	684nt	61,70	100%	95%	NCBI (CP005966.1)
Ah-pc104A	684nt	61,70	100%	95%	NCBI (CP007576.1)
Ah-YL17	702nt	63,39	93%	91%	NCBI (CP007518.1)
Am-WS	692nt	63,87	99%	86%	NCBI (CP007567.1)
As-A449	690nt	58,99	100%	88%	NCBI (CP000644.1)
Av-B565	705nt	61,84	93%	91%	NCBI (CP002607.1)

*Ah- *Aeromonas hydrophila*, Am- *Aeromonas media*, As- *Aeromonas salmonicida*, Av- *Aeromonas veronii*; ** ORF corrigidas com base na análise de BLASTn. ^A Acesso NCBI AF004392.2, ^B Acesso NCBI L78266.1, ^C Acesso NCBI M99491.1

Após a avaliação de BLASTn, as sequências nucleotídicas obtidas a partir da busca realizada no banco de dados do NCBI foram submetidas à análise de alinhamento empregando o programa BioEdit 7.0 (ANEXO I).

De acordo com os resultados obtidos a menor homologia em nível nucleotídico é observada na região inicial da ORF (entre 1-105nt), com diferenças marcantes para as linhagens de *A. hydrophila* YL-17, CHC-1, JMP636, 4AK4 e para as linhagens de *A. veronii* B565 e *A. media* WS. Estas variações indicam a existência de diversidade tanto inter, quanto intraespecífica para a ORF do gene *dns* em *Aeromonas*.

A partir da sequência obtida através de sequenciamento do gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119, foi possível deduzir sua sequência de aminoácidos correspondente. Conforme pode ser observado na Figura 33, a ORF correspondente ao gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119 apresentou uma sequência de aminoácidos constituída por 228aa com uma massa molecular teórica de 26585,36 Da, estimada empregando as ferramentas disponíveis no ambiente virtual ExPasy.

1	ATG TTT CGT CCC CTG CTC TCT CTC GCC CTG ACC CTG CTG GTC AGT	45
1	Met Phe Arg Pro Leu Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Leu Val Ser	15
46	CTG CCC CTG CAT GCC CAG ACT TTT CGC GCC GCC AAA CAG GAT CTG	90
16	Leu Pro Leu His Ala Gln Thr Phe Arg Ala Ala Lys Gln Asp Leu	30
91	AAC CGC CTC TAT CAG GAT CAC CCG GTT ACC TTC TAC TGC GGC TGC	135
31	Asn Arg Leu Tyr Gln Asp His Pro Val Thr Phe Tyr Cys Gly Cys	45
136	AAG ATT GAC TAT CAG GGC AAG AAA ATG AAG CCC GAT CTG GCC AGT	180
46	Lys Ile Asp Tyr Gln Gly Lys Lys Met Lys Pro Asp Leu Ala Ser	60
181	TGC GGC TAT GAG CCG CGC AAG CAG CCC AAG CGC GCC GCC CGC ATC	225
61	Cys Gly Tyr Glu Pro Arg Lys Gln Pro Lys Arg Ala Ala Arg Ile	75
226	GAG TGG GAA CAC GTA GTC CCC GCC TGG GAG TTC GGC CAC CAG CTG	270
76	Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp Glu Phe Gly His Gln Leu	90
271	CAG TGC TGG CAG CAG GGT GGT CGC AAG AAC TGC GAA AAA GCG AGC	315
91	Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly Arg Lys Asn Cys Glu Lys Ala Ser	105
316	CCC GAG TTC AAT AAG ATG GAG GGG GAC ATG CAC AAC CTC TTC CCC	360
106	Pro Glu Phe Asn Lys Met Glu Gly Asp Met His Asn Leu Phe Pro	120
361	GCC ATC GGC GAA GTG AAC GGC GAT CGG GCC AAC TTC CGC TTC TCC	405
121	Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Ala Asn Phe Arg Phe Ser	135
406	GAC TGG AAT GGC ACC CCG GAT CAG TAC GGC CAG TGC CGG ATG CTG	450
136	Asp Trp Asn Gly Thr Pro Asp Gln Tyr Gly Gln Cys Arg Met Leu	150

451	GTA	GAC	TTC	AAA	AAT	CGC	CAG	GTG	CAG	CCG	CCC	AAG	GGG	CCG	GTA	495
151	Val	Asp	Phe	Lys	Asn	Arg	Gln	Val	Gln	Pro	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	165
496	CGG	GGC	CAG	ATC	GCC	CGC	GCC	TAC	CTC	TAT	ATG	AGC	CAG	CAG	TAT	540
166	Arg	Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Met	Ser	Gln	Gln	Tyr	180
541	GGG	CTG	CGT	CTG	GCA	GCG	CAA	CAG	CGT	AAA	CTG	TTC	GAA	GCC	TGG	585
181	Gly	Leu	Arg	Leu	Ala	Ala	Gln	Gln	Arg	Lys	Leu	Phe	Glu	Ala	Trp	195
586	GAC	AGG	CAG	TAC	CCG	GCC	GAC	GGC	TGG	GAG	TGC	GAG	CGC	AAC	CGC	630
196	Asp	Arg	Gln	Tyr	Pro	Ala	Asp	Gly	Trp	Glu	Cys	Glu	Arg	Asn	Arg	210
631	CGC	ATC	GGC	AAG	CTG	CAG	GGC	AAT	ACC	AAC	CCC	TTT	ATT	GAA	AAG	675
211	Arg	Ile	Gly	Lys	Leu	Gln	Gly	Asn	Thr	Asn	Pro	Phe	Ile	Glu	Lys	225
676	CAG	TGC	CAA	TAA												
226	Gln	Cys	Gln	End												

Figura 33. Sequência de aminoácidos (aa), deduzida a partir da ORF do gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119.

Conforme os resultados observados e considerando que a DNase Dns apresenta uma localização extracelular, uma busca visando identificar a região correspondente à sequência líder (peptídeo sinal) foi realizada utilizando o programa SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Os resultados obtidos indicam a presença de um peptídeo sinal de 20 aa ($D\ score=0,881$) com um sítio de clivagem entre as posições 20 e 21 gerando uma proteína madura de 208 aa com uma massa molecular teórica de 24397,60 Da.

A análise comparativa visando identificar os peptídeos sinais das proteínas homólogas a Dns em representantes do gênero *Aeromonas* foi realizada (Tabela 16). Todas as demais espécies de *Aeromonas* apresentam um peptídeo sinal e uma proteína madura de tamanho molecular condizente a aqueles observados nas espécies representadas. (Dados não mostrados).

Conforme pode ser observado na Tabela 16, o tamanho do peptídeo sinal para Dns variou entre 20 e 27 aa. Por sua vez a proteína madura apresentou tamanhos variando entre 207 e 210 aa. A presença de peptídeos sinal indica que esta proteína é secretada por meio de um sistema Sec-dependente, o qual emprega uma translocase para realizar o transporte através da membrana citoplasmática (Tomás, 2012).

Tabela 16. Sequências de peptídeo sinal, posição de clivagem, D score e proteína Dns madura de *Aeromonas*. ↓ indica o ponto de clivagem.

Espécie*	Sequência	Posição de clivagem	D. score SignalP	Proteína madura
Ah- IBAer119	MFRPLLSLALTLLVSLPLHA ↓QTFRAAKQDL	20-21	0,881	208aa
Ah- ATCC14715	MFRPLLSFTLARLVSLPLHA ↓QTFRAAKQDL	20-21	0,699	207aa
Ah- JMP636	MSRPSRVLGLPLLSLGLTLLVSTPLQA ↓QEA	27-28	0,832	209aa
Ah- CHC-1	MFRPLLSLCLALLVSAPAHA ↓DNIQTFRAAK	20-21	0,910	210aa
Ah-4AK4	MFRSLFTLSVGLLISLPFISSPLQA ↓QTFRA	25-26	0,779	207aa
Ah-AL09-71	MFRPLLSLALTLLVSLPLHA ↓QTFRAAKQDL	20-21	0,882	207aa
Ah-ATCC7966	MFRPLFSFTLALLVSLPLHA ↓QTFRAAKQDL	20-21	0,843	207aa
Ah-ML09-119	MFRPLLSLALTLLVSLPLHA ↓QTFRAAKQDL	20-21	0,882	207aa
Ah-pc104A	MFRPLLSLALTLLVSLPLHA ↓QTFRAAKQDL	20-21	0,882	207aa
Ah-YL17	MRLISSLALTLLAGLPLLSAPLHA ↓QTFREA	24-25	0,849	209aa
Am-WS	MFRPLISLCLALLVSAPAHA↓ QAPQTFRAAK	20-21	0,924	210aa
As-A449	MFRPLLSVALTLLVSLPLHA ↓QTFRTAKQDL	20-21	0,862	209aa
Av-B565	MRFISLALTLLAGLPLLSAPLHA ↓QTFREA	24-25	0,846	210aa

* Ah- *Aeromonas hydrophila*, Am-*Aeromonas media*, As-*Aeromonas salmonicida*, Av-*Aeromonas veronii*.

As variações observadas no que se refere ao peptídeo sinal pode representar diferentes eficiências na secreção da enzima, uma vez que estas sequências facilitam o transporte da proteína através da membrana interna (Dodd & Pemberton, 1999).

A análise comparativa da Dns madura de IBAer119 foi realizada empregando a ferramenta BLASTp com base no banco de dados *Non-redundant protein sequence* (nr) disponível no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). A comparação revelou identidades variando entre 86 e 97%, e positivities variando de 90 a 97%. Considerando apenas as espécies representativas de *A. hydrophila*, a menor identidade (86%) foi observada para as proteínas correspondentes as linhagens JMP636 e 4AK4 (Tabela 17). A linhagem JMP636 apresentou a menor positividade entre todas as sequências de *A. hydrophila* avaliadas com um valor de 90% (Tabela 17).

Elevados índices de identidade e positividade foram constatados para as proteínas Dns correspondentes as linhagens AL09-71, ATCC7966, ML09-119 e pc104A. Além disso, elevados índices de identidade e positividade também foram observados quando a Dns madura de *A. hydrophila* IBAer119 foi comparada as linhagens de *A. media* WS, *A. salmonicida* A449 e *A. veronii* B565 (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação da proteína Dns de *A. hydrophila* IBAer119 com relação a seus homólogos em *Aeromonas*.

Espécie*	Identidade	Positividade	E value	Referência (NCBI)
Ah- IBAer119	100%	100%	0.0	-
Ah- ATCC14715	92%	97%	6e-145	AAB61738.2
Ah- JMP636	86%	90%	1e-136	AAB01347.1
Ah- CHC-1	88%	91%	3e-139	AAA21942.1
Ah-4AK4	86%	91%	9e-138	AHE48665.1
Ah-AL09-71	97%	97%	8e-154	AHX33766.1
Ah-ATCC7966	97%	97%	5e-153	ABK37189.1
Ah-ML09-119	97%	97%	8e-154	AGM45134.1
Ah-pc104A	97%	97%	8e-154	AHX70567.1
Ah-YL17	90%	93%	3e-145	AHV34340.1
Am-WS	86%	91%	6e-138	AHX60038.1
As-A449	89%	92%	3e-142	ABO89307.1
Av-B565	91%	94%	5e-147	AEB51060.1

* Ah- *Aeromonas hydrophila*, Am-*Aeromonas media*, As-*Aeromonas salmonicida*, Av-*Aeromonas veronii*.

A análise de BLASTp permitiu identificar que a Dns de *A. hydrophila* IBAer119 pertence à super família da endonuclease I (EC:3.1.21.1) e apresenta domínios conservados correspondentes a PRK15137, EndA e Endonuclease I. Os domínios correspondentes a super família da endonuclease I (EC:3.1.21.1) estão sinalizados na Figura 34.

O domínio PRK15137 corresponde a endonuclease I DNA específica e apresenta um caráter provisório. Já o domínio EndA corresponde a endonuclease I envolvida em processos de replicação, recombinação e reparo. Por sua vez, o domínio Endonuclease I corresponde a nuclease bacteriana periplasmática ou secretada EC: 3.1.21.1 com papel biológico ainda desconhecido (Focareta & Manning, 1987; Nakamura *et al.* 1992; Jakel & Wackernagel, 1995).

O alinhamento entre a sequência de aminoácidos da Dns madura de *A. hydrophila* IBAer119 e as proteínas homólogas dos representantes de *Aeromonas* foi realizado (Figura 34). Os resultados revelaram a presença de regiões conservadas entre todos os representantes de *Aeromonas* avaliados, embora pequenas diferenças foram constatadas nas proteínas alinhadas de *A. hydrophila* JMP636, *A. hydrophila* CHC-1 e *A. media* WS, *A. hydrophila* YL17, *A. salmonicida* A449 e *A. veronii* B565 (Figura 34).

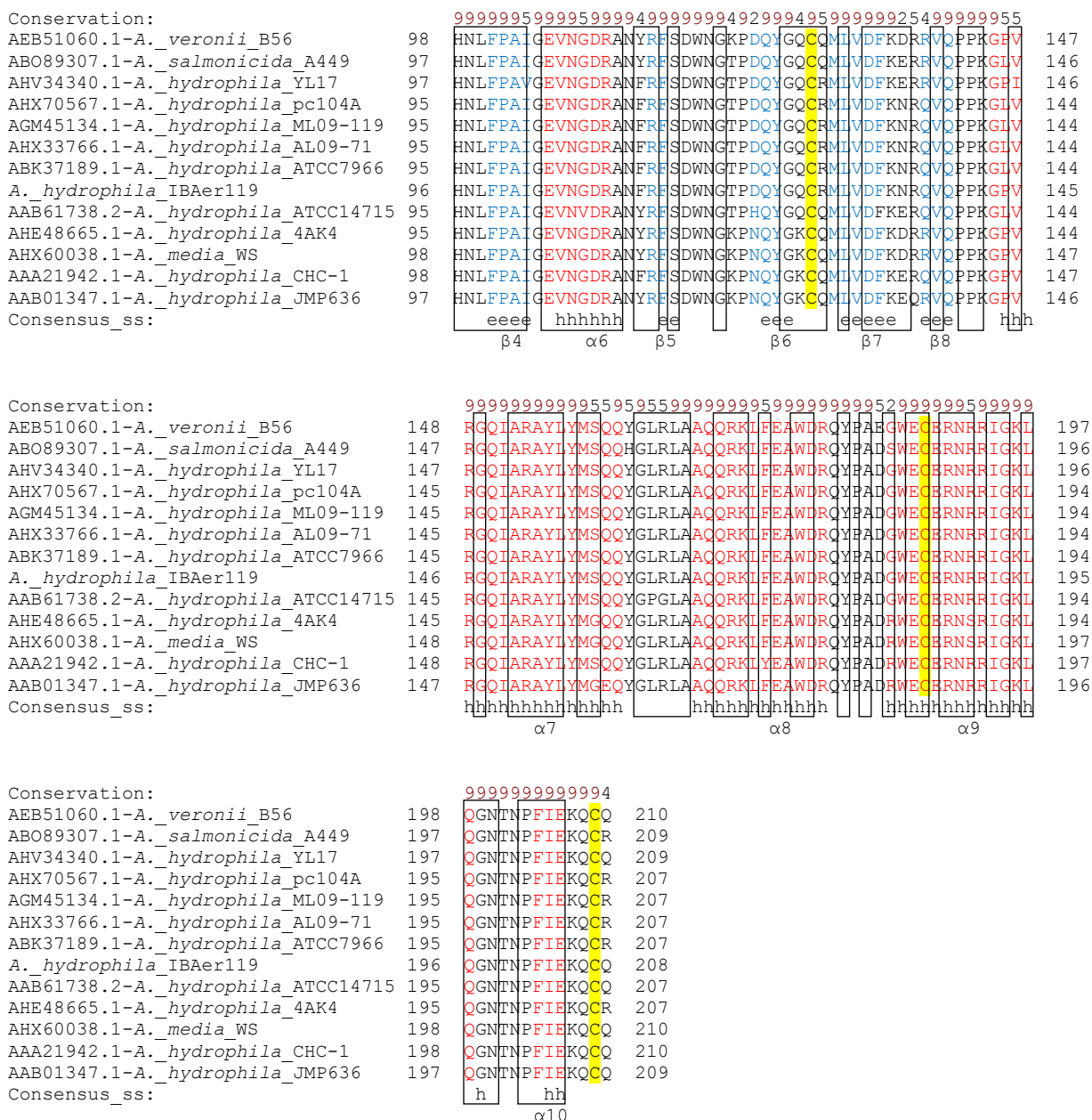


Figura 34. Análise de alinhamento e predição da estrutura secundária da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 em relação aos seus homólogos. Letras em coloração vermelha indicam α-hélices, letras em coloração azul indicam β-folhas. Números na parte superior das sequências indicam o nível de conservação de cada aminoácido. Os resíduos conservados de cisteína estão grifados em coloração amarela. Quadrantes indicam domínios conservados correspondentes a super família endonuclease I (EC: 3.1.21.1).

Com o objetivo de comparar a sequência deduzida de aminoácidos da Dns de *A. hydrophila* IBAer119 com sequências de aminoácidos correspondentes a proteínas homólogas de outras espécies bacterianas, uma nova análise de BLASTp foi realizada

sendo consideradas apenas proteínas com identidades superiores a 55% e com coberturas superiores a 90%.

Os resultados obtidos mostram que Dns de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta homologia com DNases de diversas espécies dos gêneros *Aliivibrio*, *Dickeya*, *Shewanella*, *Serratia*, *Vibrio* e *Erwinia*. Além disso, a Dns de *A. hydrophila* IBAer119 também apresentou homologia com DNases de *Escherichia coli* e *Oceanimonas smirnovii*.

A análise comparativa dos resultados permitiu observar uma maior identidade e positividade para a DNase de *Oceanimonas smirnovii* com valores de 69 e 81%, respectivamente. Já a endonuclease (EndI/EndA) de *E. coli* apresentou identidade de 62% e positividade de 72%. Considerando o gênero *Aliivibrio*, a comparação de Dns de IBAer119 em relação aos seus homólogos permitiu identificar identidades variando entre 58 e 61% com positivities de 72%. Para o gênero *Dickeya*, a análise permitiu identificar identidades variando entre 57 e 59% e positividade variando entre 71 e 73%. Por sua vez identidades entre 60 e 62% e positivities entre 71 e 73% foram observadas entre a Dns de IBAer119 e seus homólogos correspondentes em bactérias do gênero *Serratia*. Já para o gênero *Shewanella*, as DNases com homologia a Dns de IBAer119 apresentaram identidades variando de 58 a 64% e positivities variando entre 70 e 77%. Por fim, quando comparada a Dns de IBAer119 com seus homólogos correspondentes entre bactérias do gênero *Vibrio*, a análise permitiu identificar identidades entre 58 e 64% e positivities variando entre 70 e 77%. Esta similaridade pode ser visualizada em um conjunto de representantes destes gêneros representada na Figura 36. O resultado obtido indica que a Dns de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta uma maior relação com DNases dos gêneros *Serratia*, *Shewanella* e *Vibrio* em comparação aos demais gêneros avaliados. (ANEXO II).

A análise de alinhamento empregando representantes de cada gênero, com elevado grau de similaridade foi realizada (Figura 35). A avaliação permitiu identificar regiões altamente conservadas entre as diferentes espécies analisadas, indicando assim que a DNase Dns apresenta uma origem evolucionária em comum entre estas bactérias Gram-negativas (Focareta & Manning, 1987; Jekel & Wackernagel, 1995; Wu *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2004). Além disso, a análise de predição de peptídeo sinal permitiu identificar sequências líderes em todos os representantes avaliados com tamanhos variando entre 17 aa (*O. smirnovii*) a 30 aa (*S. oneidensis*), indicando que esta classe de DNase é clivada durante o transporte do meio citoplasmático para o meio extracelular resultando em uma proteína madura com tamanho molecular de aproximadamente 22-25 KDa (Li *et al.*, 2003). A comparação dos resultados obtidos em nosso estudo com aqueles descritos por Li *et al.* (2003), o qual avaliou a estrutura da DNase Vvn homologa a Dns de *Aeromonas*, mostram a presença de 8 sítios conservados caracterizados pela presença de cisteínas em todas as espécies avaliadas, indicando, conforme mencionado anteriormente, que estas cisteínas provavelmente são fundamentais para a correta conformação da proteína. Outro fato importante a ser considerado consiste na presença de dois sítios de ligação a metais, os quais são representados por um ácido glutâmico (E) e uma asparagina (N) sendo estes conservados em todas as espécies avaliadas, inclusive *A. hydrophila* IBAer119 (Figura 35).

	10	20	30	40	50
<i>A. hydrophila</i> IBAer119		-----MFRPLLSLALTLLVSLPL-HAQTFRRAAKQDNLRLYQ			
ABB72353.1 <i>Aliivibrio wodanis</i>	-----MT-----LIRLVISIIAITFSFSALSAPP--SSFSKAKKLAVKIYL				
WP_027710818.1 <i>Dickeya chrysanthemi</i>	-----MLR---NLVVFVAVLGAGLTIPALSAAQD-INNFQAKAAAVKIH				
WP_004155466.1 <i>Erwinia amylovora</i>	-----MSRKIFSSIALSLLFPPLFCHALSQGNYYQNNFSQAKAWAAQIIH				
WP_000286508.1 <i>Escherichia coli</i>	-----MYR---YLSIAAVVLSAASFSGPALAEG---INSFSQAKAAAVKVHA				
WP_019934082.1 <i>Oceanimonas smirnovii</i>	-----MR-YFILFLSLCSSLAYGEALSFRQAKKVAPETIYK				
KG49168.1 <i>Serratia marcescens</i>	-----MLR---RILEMAVFAAG-----AVQAHG-INNFQAKAAAKINQ				
WP_011071125.1 <i>Shewanella oneidensis</i>	MLNNTSIALRSRQVLLCLFSWLAVSASANASPSHPSSFSQAKVLSQSLYQ				
WP_032481929.1 <i>Vibrio cholerae</i>	-----MM---IFRFVTTLAASLP--LLTFAAP--MSFSHAKNEAVKIYQ				
WP_017789838.1 <i>Vibrio vulnificus</i>	-----MKR---LFIFIASFTAFA-----IQAAPP--SSFSAAKQQAVKIYQ				
Clustal Consensus				. * ** :	

131

em vermelho.

A modelagem tridimensional da DNase Dns madura de *A. hydrophila* IBAer119 foi realizada empregando o *web server* Phyre² (Kelley & Sternberg, 2009). Todos os resíduos foram modelados com um grau de confiança superior a 90% com base na estrutura cristalográfica da endonuclease IuouA, a qual corresponde a nuclease Vvn de *V. vulnificus*, e subsequente exibida empregando o programa Swis PdbViewer versão 4.1. A comparação entre o modelo gerado para a Dns de *A. hydrophila* IBAer119 e estrutura da endonuclease IuouA de *V. vulnificus*, pode ser observada na Figura 36.

Conforme pode ser visto, apesar da elevada similaridade, algumas diferenças podem ser verificadas, as quais, se referem à ausência de uma folha- β após a segunda hélice- α e a um maior tamanho nas três últimas folhas- β localizadas mais próximo a região C-terminal da Dns de *A. hydrophila* IBAer119.

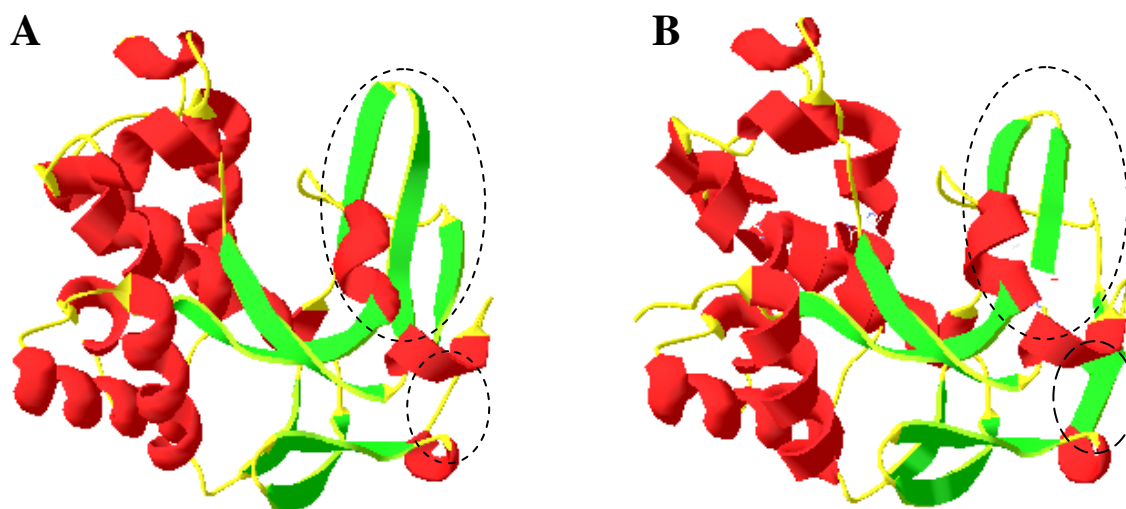


Figura 36. Modelo estrutural tridimensional da proteína Dns de *A. hydrophila* IBAer119 (A), baseado na endonuclease IuouA de *V. vulnificus* (B). Círculos tracejados indicam diferenças entre o modelo de Dns e IuouA.

A análise da Dns de *A. hydrophila* IBAer119 revelou ainda que esta enzima apresenta uma estrutura em formato de V com quatro pontes dissulfeto localizadas entre

as posições Cys25-Cys41 correspondendo a uma ligação β - α , Cys23-Cys127 correspondendo a uma ligação entre duas regiões de *coils*, Cys72-Cys81 correspondendo a uma ligação entre duas regiões contendo α -hélices e por fim Cys186-Cys207 correspondendo a uma ligação entre α -hélice e *coil* (Figura 37).

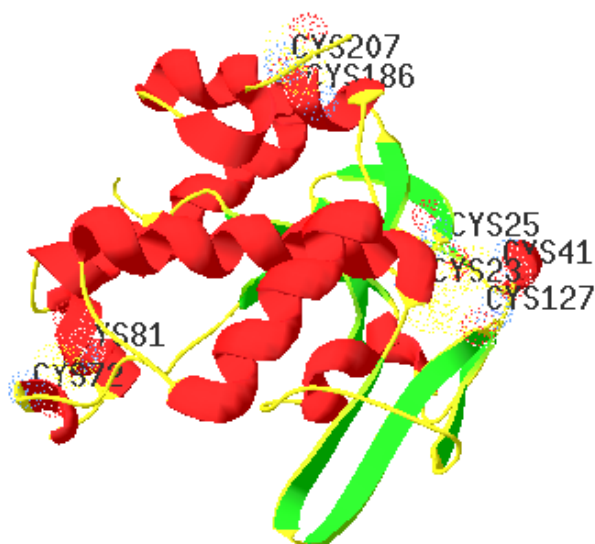


Figura 37. Modelo estrutural tridimensional da proteína Dns de *A. hydrophila* IBAer119 representando as quatro ligações dissulfeto.

Estes resultados são compatíveis com aqueles observados por Li *et al.* (2003) em seu estudo envolvendo a endonuclease Vvn de *V. vulnificus*, reforçando assim a ideia de que estas pontes dissulfeto são de fundamental importância para a manutenção da estrutura espacial e a atividade desta enzima.

A análise de predição de sítios de ligação a metais foi realizada empregando o *web server* 3DligandSite (Wass et al., 2010) e subsequentemente exibida empregando o programa Swis PdbViewer versão 4.1. A avaliação possibilitou a identificação de um cluster formado por cinco ligantes correspondendo a quatro moléculas de magnésio (Mg) e uma molécula de cálcio (Ca). As coordenadas de ligação foram identificadas como correspondentes as posições Glu58 e Asn106. Detalhes referentes aos sítios de ligação a metais podem ser visualizados na Figura 38.

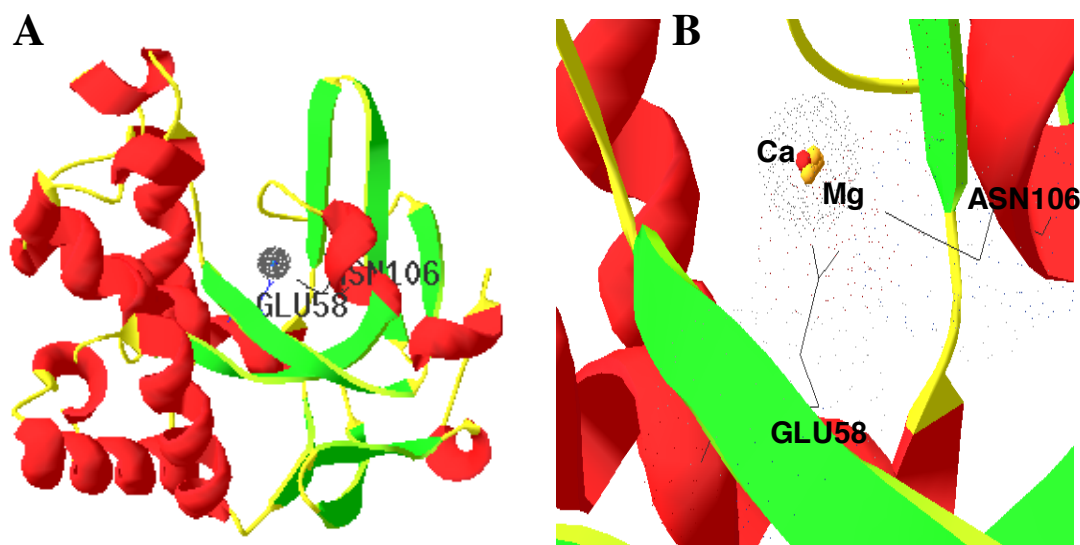


Figura 38. Visão geral (A) e detalhada (B) do cluster correspondente ao sítio de ligação a metais da proteína Dns de *A. hydrophila* IBAer119.

Estes resultados são similares a aqueles observados por Li *et al.* (2003) em seu estudo envolvendo a endonuclease Vvn de *V. vulnificus* e suportam aqueles anteriormente discutidos no presente estudo os quais mostram que a Dns de *A. hydrophila* IBAer119 consiste em uma DNase magnésio dependente.

A análise de predição de sítios catalíticos presentes na DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 foi realizada empregando o *web server* EXIA2 (Lu *et al.*, 2014) e posteriormente exibida empregando o programa Swis PdbViewer versão 4.1. Esta avaliação permitiu identificar que a Dns madura apresenta quatro resíduos (Glu58, His59, Asn106 e Arg109), com alta probabilidade de estarem envolvidos na formação do sítio catalítico desta enzima. Estes resíduos são compatíveis com aqueles evidenciados na endonuclease Vvn caracterizada por Li *et al.* (2003). Conforme pode ser observado, este sítio catalítico contém duas folhas- β antiparalelas e uma α hélice C-terminal com um íon divalente metálico localizado no centro (Figura 39 A). Este tipo de topologia ($\beta\beta\alpha$ -metal) tem sido revelado em regiões de sítio ativo de muitas endonucleases (Friedhoff *et al.*, 1999), entre elas, uma nuclease de *Serratia* (Miller *et al.*, 1994), Vvn de *V. vulnificus* (Li

et al. 2003), além de outras como endonuclease I-*PpoI* (Flick *et al.*, 1998), fago T4 endo VII (Raaijmakers *et al.*, 1999), H-N-H ColE7 (Cheng *et al.*, 2002) e ColE9 (Kleanthous *et al.*, 1999). Dentre estas DNases, I-*PpoI* é a única endonuclease sítio específica reconhecida e cliva DNA dupla fita com uma sequência específica de 13-15pb (Ellison, 1993).

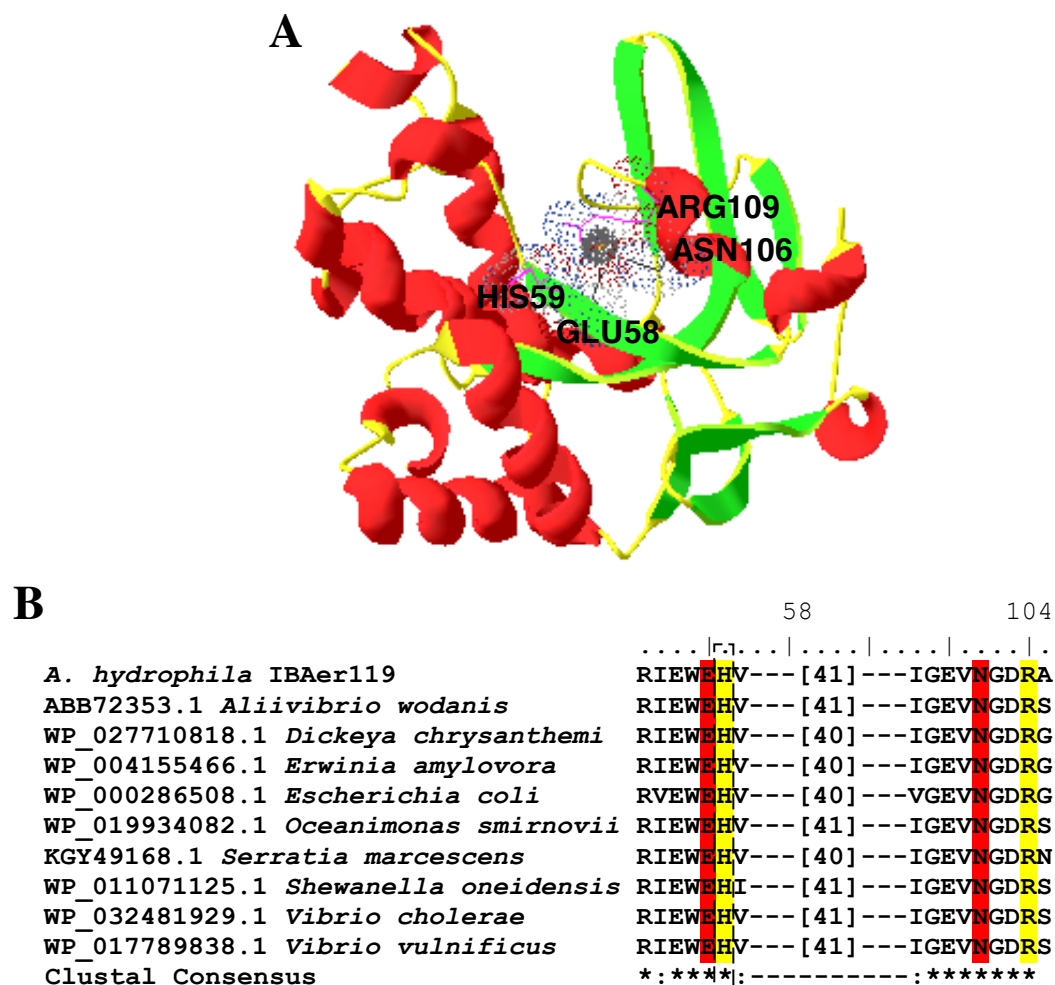


Figura 39. Representação do sítio ativo da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 (A). Alinhamento correspondente a região do sítio ativo em diferentes espécies de bactérias (B). Letras amarelas e vermelhas representam os resíduos correspondentes ao sítio ativo da enzima. Letras marcadas na coloração vermelha indicam resíduos responsáveis pela ligação a metal. Quadrantes tracejados correspondem a His59, resíduo importante para a hidrólise de DNA.

A nuclease de *Serratia* spp e a de ColE7 são nucleases não específicas e clivam DNA fita simples, fita dupla e RNA com pouca preferência por sequências específicas (Friedhoff *et al.*, 1996; Ku *et al.*, 2002). Já a nuclease endo T4 VII reconhece perturbações estruturais no DNA, clivando uma variedade de estruturas ramificadas do DNA, tais como, junções *holliday*, DNA cruciforme, bases simples despareadas e sítios abásicos (Greger & Kemper, 1998).

A análise do alinhamento das proteínas de *A. wodanis*, *D. chrysanthemi*, *E. amylovora*, *E. coli*, *O. smirnovii*, *S. marcescens*, *S. oneidensis*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*, homologas à Dns de *A. hydrophila* IBAer119 revelou que os resíduos Glu58, His59, Asn106 e Arg109 são conservados entre as diferentes espécies avaliadas (Figura 40 B), indicando que estes resíduos podem desempenhar um papel similar nestas DNases. Outro evento importante a ser considerado é que His59 a qual corresponde a His80 no alinhamento realizados por Li *et al.* (2003), pois os autores consideraram a sequência correspondente ao peptídeo sinal da nuclease Vvn de *V. vulnificus*, indica desempenhar um papel crítico na hidrólise do DNA, pois uma mutação em His80 para uma alanina aboliu a atividade endonucleásica de Vvn.

A similaridade observada na região correspondente ao sítio ativo da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 em relação a outras bactérias Gram-negativas e particularmente a endonuclease Vvn de *V. vulnificus* (Li *et al.*, 2003) indica que estas enzimas podem utilizar o mesmo mecanismo catalítico para hidrolisar DNA.

5.7.4 Clonagem e expressão do gene *Aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119

Para a clonagem do gene, foi construído um par de *primers* designados como *ahaclonF* e *ahaclonR* (item 4.11.1) com base nas sequências de *Aeromonas* depositada no GenBank. Estes *primers* foram projetados de tal forma a compreender o gene estrutural sem seu respectivo promotor, mas com seu terminador. Utilizando os *primers*

desenhados foi amplificado um segmento de 2245pb (Figura 40), que foi ligado diretamente no vetor pCR™2.1 TOPO®, sendo esta mistura de ligação utilizada para transformar a linhagem *E. coli* DH5α.

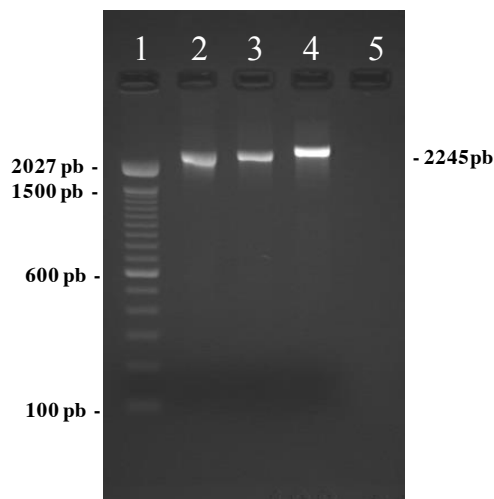


Figura 40. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) correspondente à amplificação do fragmento contendo a ORF do gene *aha3441* empregado na ligação. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (1), fragmento contendo a ORF do gene *aha3441* de IBAer119 (2,3,4), controle negativo (5).

Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB acrescido de 30µg/mL de Canamicina e os clones provenientes destas placas foram posteriormente confirmados em meio DNase Test Agar (MERCK), acrescido de 0,01g/L de azul de toluidina e 30µg/mL de canamicina. Com base na atividade demonstrada em placas de DNase Test Agar o clone designado como IBAer119-ahaC8 foi selecionado. O DNA plasmidial de IBAer119-ahaC8 foi extraído empregando Kit NucleoSpin® Plasmid (MN), conforme as recomendações do fabricante. Este transformante apresentou um plasmídeo com aproximadamente 6176 pb onde 3931 pb correspondem ao vetor e 2245 pb correspondem ao fragmento contendo a ORF do gene *aha3441*. Um esquema representando o mapa do vetor e do gene clonado pode ser apreciado na Figura 41.

Com o objetivo de confirmar a clonagem do gene *aha3441*, o DNA plasmidial extraído a partir do transformante IBAer119-ahaC58 foi submetido a um novo PCR

empregando os *primers* *aha3441-1F*, *aha3441-1R* e *aha3441-2F*, *aha3441-2R* (item 4.11.5), sendo os dois fragmentos correspondentes a cada um dos pares de *primers* submetidos à análise de sequenciamento.

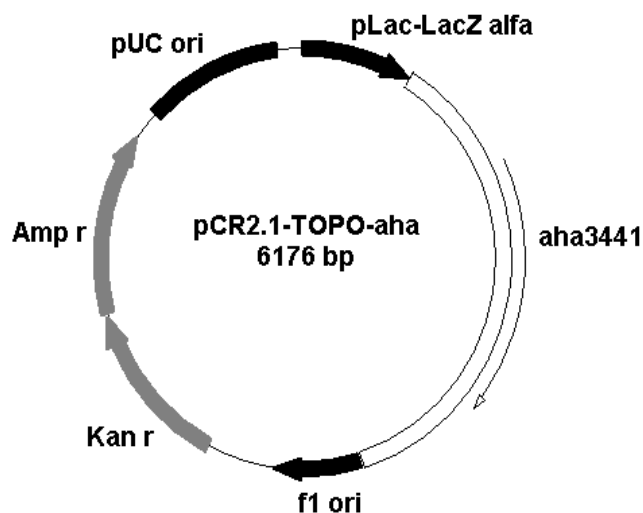


Figura 41. Mapa representando a construção do vetor contendo o gene *aha3441*.

De acordo com o resultado obtido, podemos observar dois fragmentos, um com aproximadamente 1043 pb, o qual corresponde à região inicial da ORF do gene *aha3441* e o segundo fragmento com aproximadamente 1290 pb correspondendo à região final da ORF do gene *aha3441*. (Figura 42).

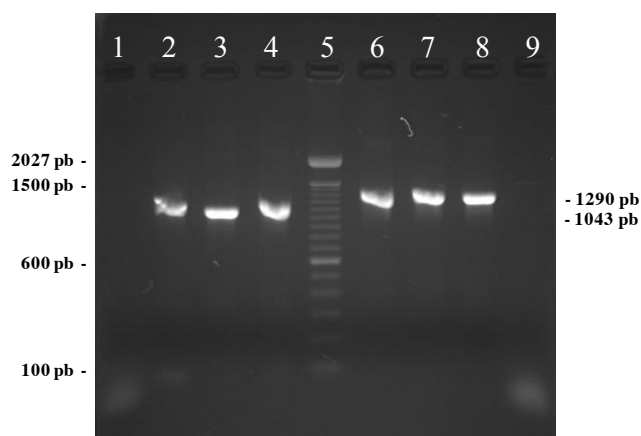


Figura 42. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) para a confirmação da clonagem do gene *aha3441* em IBAer119-ahaC8. DH5 α (1), gene *aha3441* amplificado com os *primers* *aha3441-1F* e *aha3441-1R* no transformante IBAer119-ahaC8 (2 e 3), controle positivo amplificado com os *primers* *aha3441-1F*, *aha3441-1R* no isolado IBAer119 (4), Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (5), gene *aha3441* amplificado

com os *primers* aha3441-2F e aha3441-2R no transformante IBAer119-ahaC8 (6 e 7), controle positivo amplificado com os *primers* aha3441-2F, aha3441-2R no isolado IBAer119 (8), controle negativo (9).

Nenhuma alteração nucleotídica foi observada quando comparados sequenciamentos obtidos a partir de IBAer119 e IBAer119-ahaC8, confirmando mais uma vez a correta clonagem do gene *aha3441* em *E. coli* DH5 α .

Com o objetivo de determinar a expressão da proteína Aha3441 recombinante, a avaliação da relação entre o diâmetro do halo de atividade e o diâmetro do crescimento bacteriano observados em placas de DNase Test Agar acrescido de 0,01g/L de azul de toluidina foi realizada empregando a linhagem receptora DH5 α , a linhagem doadora *A. hydrophila* IBAer119 e o transformante IBAer119-ahaC8 por um período de 24, 48 e 72h.

Conforme pode ser observado na Tabela 18, nenhuma atividade foi verificada para linhagem receptora DH5 α independente o tempo de avaliação. Por outro lado, a linhagem doadora IBAer119 apresentou uma elevada atividade DNásica em virtude de este isolado produzir um conjunto de enzimas com atividade sobre DNA. Por sua vez, o transformante exibiu atividade DNásica após 48h de incubação, a qual aumentado após 72h indicando desta forma que *E. coli* DH5 α foi capaz de processar e secretar a enzima Aha3441 clonada.

Tabela 18. Atividade DNásica dos parentais e transformante em placas de *DNase Test Agar*.

Linhagem	Estatus	Atividade DNásica relativa ¹		
		24 h	48 h	72 h
DH5 α	Linhagem receptora <i>E. coli</i>	0,00 $\pm$ 0,00 ^C	0,00 $\pm$ 0,00 ^C	0,00 $\pm$ 0,00 ^C
IBAer119	Linhagem doadora <i>A. hydrophila</i>	2,68 $\pm$ 0,12 ^A	4,57 $\pm$ 0,23 ^A	5,28 $\pm$ 0,09 ^A
IBAer119-dnsC5	Transformante	0,00 $\pm$ 0,00 ^B	1,09 $\pm$ 0,10 ^B	1,83 $\pm$ 0,16 ^B

¹Médias seguidas por letra distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

A avaliação do crescimento e da atividade DNásica extracelular (Figura 43), permitiu observar que a linhagem receptora DH5 α apresenta apenas atividade DNásica residual durante o crescimento bacteriano, enquanto, a linhagem doadora IBAer119 exibe um aumento da atividade DNásica extracelular a partir das 4 h mostrando um decréscimo após 20 h de crescimento, coincidindo com a entrada da bactéria em fase estacionária de crescimento, conforme mencionado anteriormente. Já o transformante IBAer119-ahaC8 exibiu um aumento na atividade DNásica extracelular a partir das 8 h de cultivo, atingindo o máximo de atividade ($49,58 \pm 0,35$ U/mL/min) com 24 h de crescimento, permanecendo relativamente estável mesmo após 48 h de avaliação.

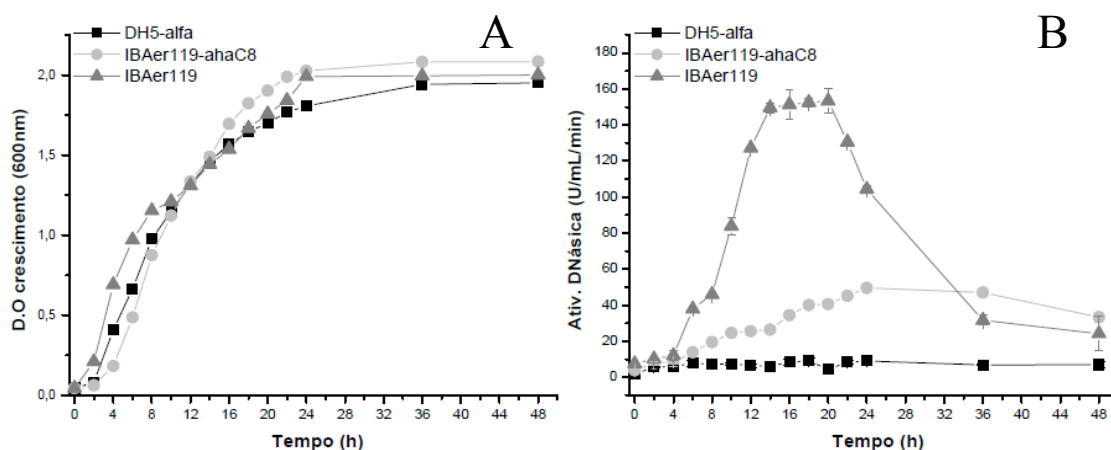


Figura 43. Curva de crescimento (A) e atividade DNásica extracelular (B) das linhagens *A. hydrophila* IBAer119, *E. coli* DH5 α e o transformante IBAer119-ahaC8 em meio LB.

Considerando que o crescimento bacteriano da linhagem doadora IBAer119 e do transformante IBAer119-ahaC8 foi semelhante, uma análise da relação entre o máximo da atividade DNásica total da linhagem doadora em relação ao máximo da atividade DNásica do transformante, indicou que a atividade DNásica do transformante IBAer119-ahaC8 corresponde a 32,33% da atividade total observada para a linhagem doadora IBAer119. Uma comparação entre as atividades DNásicas das duas enzimas clonadas a partir do isolado de *A. hydrophila* IBAer119 (Dns e Aha3441), foi realizada.

De acordo com os resultados observados, os transformante IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8 apresentaram um crescimento bastante similar. A avaliação da curva de atividade DNásica permitiu observar um aumento na atividade a partir de 6h de crescimento para o transformante IBAer119-dnsC5, enquanto que para o transformante IBAer119-ahaC8 o aumento na atividade foi observado com 8h de cultivo. Ambos os transformante apresentaram um máximo de atividade DNásica com 24h de cultivo, com valores de $173,08 \pm 1,76$ U/mL/min e $49,58 \pm 0,35$ U/mL/min para o transformante IBAer119-dnsC5 e IBAer119-ahaC8, respectivamente. Estes resultados indicam que a enzima Aha3441 apresenta uma menor taxa de expressão e/ou eficiência na translocação para o ambiente extracelular em comparação a DNase Dns. Isto pode estar associado ao tamanho molecular de cada DNase uma vez que Dns apresenta uma massa molecular de aproximadamente 22 KDa, enquanto que Aha3441 apresenta uma massa molecular de cerca de 85 KDa.

A partir dos resultados obtidos, foi realizada a caracterização da enzima Aha3441 clonada, empregando o extrato extracelular proveniente do transformante IBAer119-ahaC8. Neste contexto, a DNase Aha3441 foi caracterizada quanto ao efeito de diferentes fatores físicos e químicos que possam afetar sua atividade.

5.7.5 Caracterização enzimática da DNase Aha3441 recombinante de *A. hydrophila* IBAer119.

5.7.5.1 Efeito de cofatores (cátions) na atividade enzimática extracelular da DNase recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes cofatores sobre a atividade DNásica da enzima Aha3441, extratos extracelulares proveniente do transformante IBAer119-ahaC8 crescido em meio LB acrescido de $30 \mu\text{g/mL}$ de canamicina a 37°C

por 18 h, foram incubados na presença de MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 , MnCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 e FeSO_4 a uma concentração final de 5mM. O gráfico representando as atividades em função dos diferentes cofatores empregados na análise esta evidenciado na Figura 44.

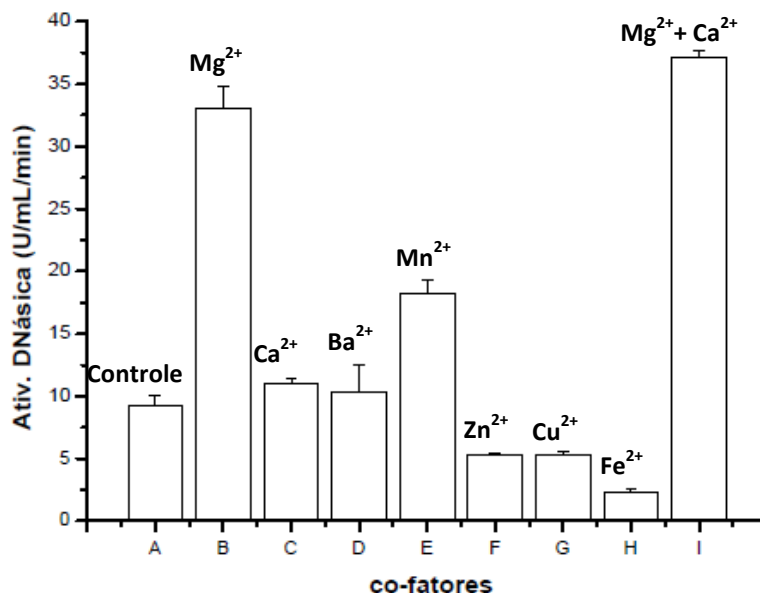


Figura 44. Relação da atividade DNásica da enzima recombinante Aha3441 em função dos diferentes cofatores empregados. 10 mM Tris-HCl pH8 (A), acrescido de: 5 mM MgCl_2 (B), 5 mM CaCl_2 (C), 5 mM BaCl_2 (D), 5 mM MnCl_2 (E), 5 mM ZnSO_4 (F), 5 mM CuSO_4 (G), 5 mM FeSO_4 (H), e 5 mM MgCl_2 + 2 mM CaCl_2 (I).

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que Aha3441 recombinante foi ativa mesmo na ausência de adição de qualquer íon metálico com uma atividade de $9,25 \pm 0,82$ U/mL/min, valor este similar aos observados quando 5 mM de CaCl_2 ou BaCl_2 ou MnCl_2 forma utilizados, com valores de atividade correspondentes a $11,08 \pm 0,35$ e $10,33 \pm 2,12$ U/mL/min, respectivamente. Um pequeno estímulo na atividade DNásica foi observado quando MnCl_2 foi adicionado a reação, com valor correspondente a $18,25 \pm 1,06$ U/mL/min. As maiores atividades DNásicas foram observadas quando 5 mM MgCl_2 ou a combinação de 5 mM MgCl_2 e 2 mM CaCl_2 foram adicionados a reação, com valores de $33,00 \pm 1,88$ e $37,16 \pm 0,47$ U/mL/min, respectivamente. A adição de ZnSO_4 , CuSO_4 ou FeSO_4 provocou uma forte redução na

atividade DNásica com valores de $5,25 \pm 0,11$, $5,25 \pm 0,35$ e $2,25 \pm 0,36$ U/mL/min, respectivamente, sendo um comportamento similar a este também observado para a DNase Dns avaliada neste estudo.

Um forte efeito inibidor foi observado quando Cu^{2+} ou Fe^{3+} foram utilizados como cofatores na avaliação da atividade DNásica de uma nuclease designada como GBSVI-NSN clonada a partir do bacteriófago GBSVI, indicando que estes metais podem afetar a atividade DNásica (Zhang & Song, 2008).

Assim como para a DNase Dns, as maiores atividades correspondentes a DNase Aha3441 foram observadas quando MgCl_2 ou a combinação de MgCl_2 e CaCl_2 foram adicionados a reação, indicando desta forma que Aha3441 utiliza magnésio como cofator.

5.7.5.2 Efeito de inibidores na atividade enzimática da DNase extracelular recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Com o intuito de avaliar o efeito de inibidores sobre a atividade DNásica de Aha3441 recombinante, extratos extracelulares proveniente do transformante IBAer119-ahaC8 crescido por 18 h a 37°C em meio LB acrescido de $30 \mu\text{g/mL}$ de canamicina, foram incubados na presença dos agentes quelantes EDTA, citrato de sódio, e fosfato de sódio a uma concentração final de 10 mM. O extrato extracelular também foi incubados na presença dos agentes redutores tiol DTT e β -mercaptoetanol, a uma concentração final de 10 mM. Além disso, o extrato extracelular foi submetido ao tratamento na presença do detergente SDS a uma concentração final de 1%.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que a enzima Aha3441 mostrou-se ativa mesmo na presença do agente redutor DTT, com atividade de $36,50 \pm 0,23$ U/mL/min, indicando que este composto não apresenta efeito inibitório

significativos sobre a atividade desta DNase. Para extratos tratados com β -mercaptoetanol uma redução de 24,11% em relação à atividade DNásica sem inibidores foi constatada. No que se refere aos agentes quelantes à atividade de Aha3441 mostrou-se pouco afetada na presença de citrato de sódio, com valores de $36,16 \pm 1,17$ U/mL/min, correspondendo a 96,01% da atividade original (Figura 45).

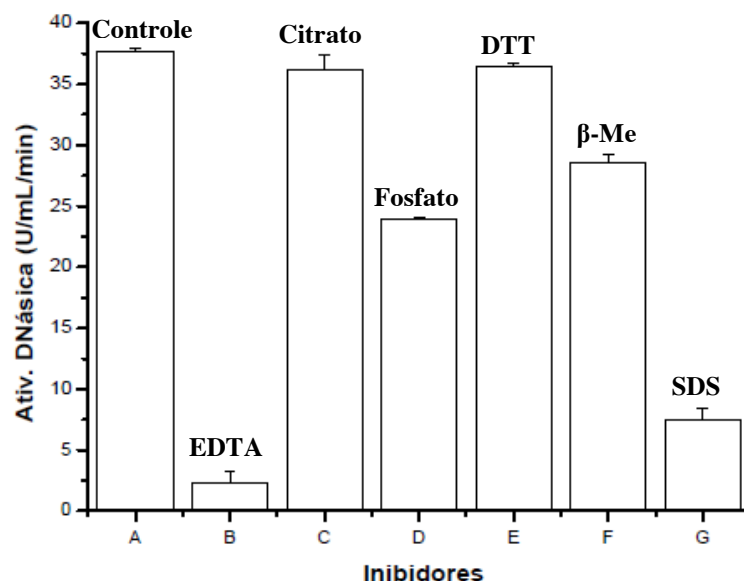


Figura 45. Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Aha3441. Controle sem adição de inibidores (A), EDTA 10 mM (B), Citrato de sódio 10 mM (C), Fosfato de sódio 10 mM (D), DTT 10 mM (E), β -mercaptoetanol 10mM (F) e SDS 1% (G).

O emprego de fosfato de sódio apresentou um efeito inibidor intermediário, com atividade DNásica de $23,91 \pm 0,11$ U/mL/min, a qual corresponde a uma redução de 36,51% em relação à atividade original. Por outro lado, Aha3441 foi consideravelmente inibida quando EDTA foi adicionado à reação, com valores de atividade caindo para $2,25 \pm 1,06$ U/mL/min, correspondendo a apenas 5,97% da atividade original. A enzima Aha3441 também foi fortemente inibida quando o detergente SDS foi adicionado à reação, mostrando uma atividade de apenas $7,50 \pm 0,94$ U/mL/min, correspondendo a uma redução na atividade DNásica de 80,08%.

Os resultados observados no presente trabalho mostram que 10mM de EDTA foi capaz de inibir consideravelmente a atividade de Aha3441. Considerando a capacidade que EDTA apresenta em sequestrar íons divalentes positivos, o resultado obtido é condizente com aqueles encontrados anteriormente onde ficou evidente que Mg^{2+} é preferencialmente utilizado como cofator por esta enzima.

Os resultados sugerem que a enzima Aha3441 clonada a partir de *A. hydrophila* IBAer119 pode ser caracterizada como uma metalo-DNase. Da mesma forma que observado para a enzima Dns anteriormente clonada, o feito de citrato de sódio e fosfato de sódio foram menos pronunciados no que diz respeito à inibição da DNase Aha3441. Assim como mencionado anteriormente, apesar de serem considerados agentes quelantes, ambos apresentam maior afinidade por Ca^{2+} (Zittle *et al.* 1956), tornando plausível desta forma seu reduzido efeito inibitório, uma vez que Aha3441 também não requer preferencialmente Ca^{2+} para sua atividade.

5.7.5.3 Efeito do pH na atividade enzimática da DNase extracelular recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para determinar o pH de ação da DNase Aha3441 recombinante, os extratos extracelulares do transformante IBAer119-ahaC8 crescido por 18 h a 37°C em meio LB acrescido de 30 µg/mL de Canamicina, foram incubados em soluções com pHs variando de 3 a 9, em dois diferentes tampões, a uma concentração final de 20 mM. Para pHs entre 3 e 6 utilizou-se tampão citrato, enquanto que, para pHs variando de 7 a 9 utilizou-se tampão Tris-HCl.

Conforme os resultados obtidos, Aha3441 recombinante apresenta um pH de ação variando de 7,0 a 9,0, com melhor atividade DNásicas em pH 8,0. As atividades DNásicas observadas para os pHs 7,0 e 9,0 foram bastante similares, com valores de $31,75 \pm 0,11$ U/mL/min e $33,58 \pm 2,24$ U/mL/min, enquanto que para o pH 8,0 a atividade DNásica foi de $37,58 \pm 0,23$ U/mL/min, correspondendo a um incremento na atividade de 15,51% em relação ao pH 7,0 e 10,64% em relação ao pH 9,0. Em pHs inferiores a 7,0, a atividade DNásicas de Aha3441 foi bastante reduzida, com valores de $5,25 \pm 0,35$, $5,66 \pm 0,23$, $8,66 \pm 0,70$ e $8,83 \pm 0,23$ U/mL/min para os pHs 3, 4, 5 e 6, respectivamente (Figura 46).

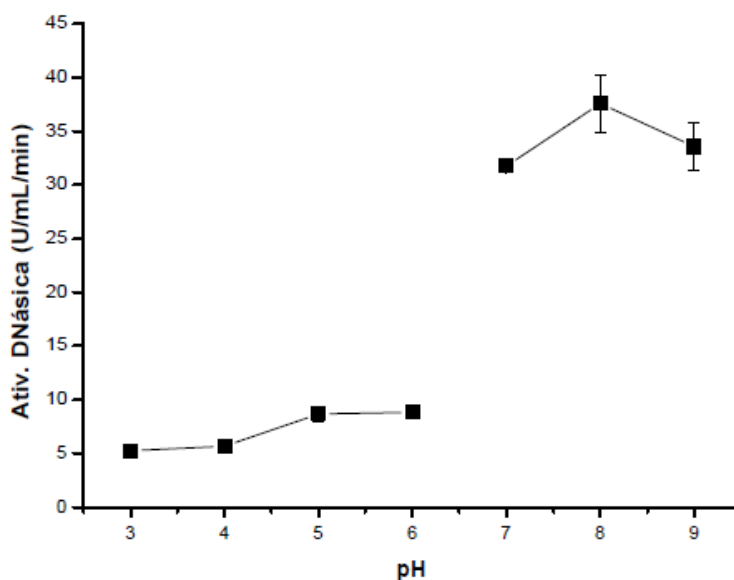


Figura 46. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da DNase Aha3441 recombinante de *A. hydrophila* IBAer119.

A DNase Aha3441 apresentou um comportamento bastante similar a DNase Dns anteriormente clonada. No entanto, uma pequena diferença foi observada no que se refere a faixa de pH de ação correspondente a cada uma das DNases. Enquanto que para Dns a melhor faixa de ação foi entre pH 8,0 e 9,0, para Aha3441, a melhor faixa de ação foi restrita ao pH 8,0, embora elevadas atividades tenham sido observadas em pHs 7,0 e 9,0. Da mesma forma que para a DNase Dns, podemos concluir que a DNase Aha3441 é

uma enzima com melhor ação em pHs alcalinos, podendo ser caracterizada como uma DNase alcalina.

5.7.5.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática da DNase extracelular recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para estipular a temperatura ótima de ação de Aha3441 recombinante, os extratos extracelulares provenientes do transformante IBAer119-ahaC8 crescido por 18h a 37°C em meio LB acrescido de 30 µg/mL de Canamicina, foram submetidos a análises de atividade DNásica em temperaturas de incubação variando de 20 a 90°C.

Conforme os resultados mostrados na Figura 47, foi possível constatar que a DNase Aha3441 apresentou atividade em todas as temperaturas testadas, no entanto, o ótimo de temperatura para a atividade desta enzima varia entre 37°C e 50°C, com valores de atividade de $37,41 \pm 0,35$ U/mL/min a 37°C, $37,08 \pm 0,36$ U/mL/min a 40°C e $34,41 \pm 2,24$ U/mL/min a 50°C. Apesar do ótimo de temperatura variar entre 37°C e 50°C, elevadas atividades também foram observadas quando Aha3441 foi incubada a temperaturas de 30°C, com valores de atividade de $29,41 \pm 2,00$ U/mL/min.

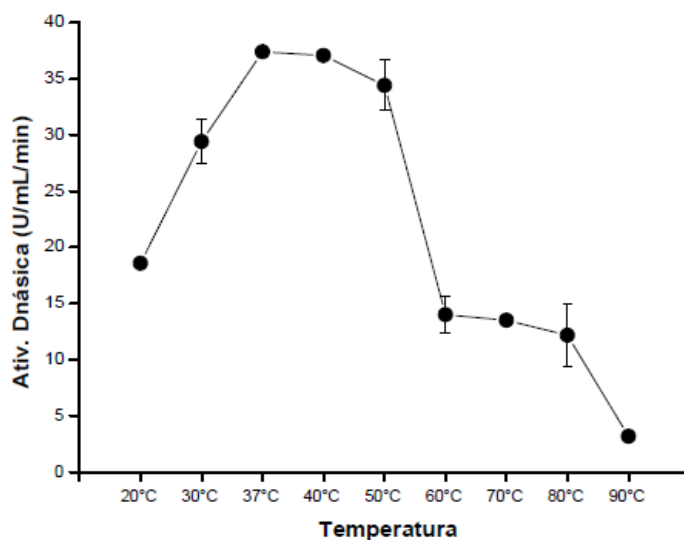


Figura 47. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática ótima da DNase recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119.

Conforme pode ser observado, temperaturas de incubação superiores a 50°C reduzem de forma consistente a atividade DNásica de Aha3441. Quando os extratos extracelulares contendo enzima Aha3441 foram incubados a temperaturas de 60°C, 70°C e 80°C, as atividades observadas foram de $14,00 \pm 1,64$ U/mL/min, $13,50 \pm 0,23$ U/mL/min e $12,16 \pm 2,83$ U/mL/min, respectivamente. Já os extratos extracelulares contendo enzima Aha3441 incubados a 90°C apresentaram atividades DNásica de $3,16 \pm 0,24$ U/mL/min, correspondendo a 8,44% da atividade observada quando Aha3441 foi incubada a 37°C.

A comparação entre as faixas de temperatura nas quais Dns e Aha3441 foram incubadas foi realizada, tornando possível observar que Aha3441 apresentou elevadas atividades em temperaturas variando entre 37°C e 50°C, já Dns apresentou elevadas atividades em temperaturas variando de 37°C a 60°C, indicando assim que a DNase Aha3441 é mais afetada pela temperatura, apresentando uma faixa de temperatura de ação mais restrita, em relação à DNase Dns.

5.7.5.5 Estabilidade térmica da DNase extracelular recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

Para avaliar a estabilidade térmica da DNase Aha3441 recombinante, os extratos extracelulares do transformante IBAer119-ahaC8 crescido por 20 h a 37°C em meio LB acrescido de 30µg/mL de Canamicina, foram pré-incubados em temperaturas de 40, 60 e 90°C por tempos variando entre 5 e 60 min.

Os resultados obtidos mostram que Aha3441 apresenta pequena redução na atividade após 5 min. de pré-tratamento a temperatura de 40°C, se mantendo relativamente estável entre 10 e 50 min. de pré-tratamento. Embora outra queda na atividade tenha sido observada com 60 min. de pré-tratamento a 40°C, a atividade detectada foi de $27,58 \pm 0,59$ U/mL/min, correspondendo a uma atividade remanescente

de 68,38% em relação à amostra não pré-tratada. Já em temperaturas de 60°C e 90°C, o comportamento da DNase Aha3441 foi bastante similar apresentando uma rápida redução na atividade entre 5 e 10 min. com uma gradual redução nos tempos de tratamentos subsequentes. Mesmo após 60 min. de pré-tratamento térmico a 60°C ou 90°C atividades DNásicas foram observadas, no entanto estas atividades correspondem em média a 16,41% da atividade da enzima sem pré-tratamento térmico (Figura 48).

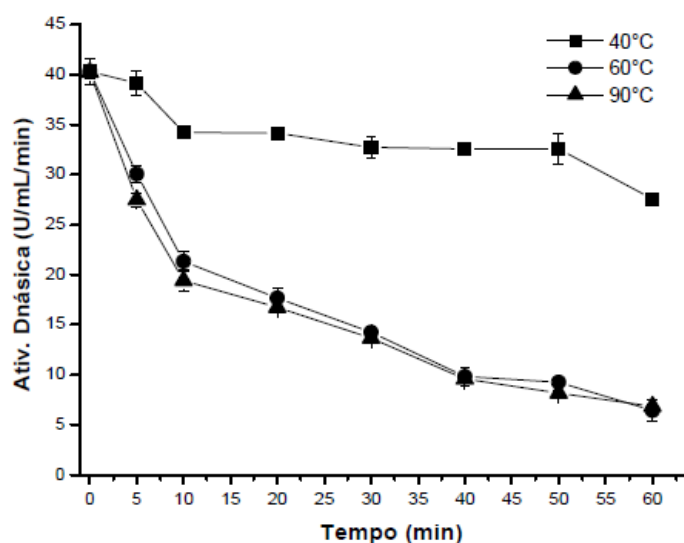


Figura 48. Efeito do pré-tratamento térmico sobre a atividade enzimática da DNase recombinante Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119.

Assim como para a DNase Dns, Aha3441 se manteve ativa, embora com uma pequena atividade ($6,83 \pm 0,23$ U/mL/min), mesmo quando submetida a um pré-tratamento térmico de 90°C por 60 min. Desta forma podemos afirmar que Aha3441 é uma DNase com relativa estabilidade térmica em temperaturas de 60 e 90°C, sob as condições testadas.

5.7.6 Análise de Bioinformática *in silico* da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

5.7.6.1 Análise de Bioinformática da sequência nucleotídica e proteica da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119

O produto de PCR com tamanho molecular de 2245pb, correspondente ao fragmento contendo a ORF (*Open Read Frame*) do gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119, foi clonado no vetor pCR™2.1 TOPO®. A análise da sequência obtida através de sequenciamento permitiu identificar uma ORF de 2145 nt (Figura 49).

```

      10      20      30      40      50
IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      60      70      80      90     100
IBAer119-ahaC8  ATGAAAGGAACACGTAACCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTTCGCTCGC
      110     120     130     140     150
IBAer119-ahaC8  CTCCCCGTCCGTCTATGCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGGCCGACAGCGCCC
      160     170     180     190     200
IBAer119-ahaC8  TCACCCCGATCCCGGTCAATTCAGGGCAGCGGCGACAAGAGCCCCGCTCATT
      210     220     230     240     250
IBAer119-ahaC8  CCCGCCGACAAGTTCGAAAGCCCCCAGAGTGTTCATGGTCAAGGCAGTGGT
      260     270     280     290     300
IBAer119-ahaC8  CTCTGGCCCTTGGCGAGAGCCTCAACAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGC
      310     320     330     340     350
IBAer119-ahaC8  AGGGAGACGGCAACCCCCAGACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCTGAAC
      360     370     380     390     400
IBAer119-ahaC8  GACAAGAACTTCGCCAGCAAGTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGT
      410     420     430     440     450
IBAer119-ahaC8  CTGCTGGAGGCCAAGGTCGAGGAGTATTACAACCACACCCAGCTCAAGC
      460     470     480     490     500
IBAer119-ahaC8  CGGTGTTTGACAGCGGTACCCCGCGCCTGCGAGGTCTGCGCCCGAGGGCTCG
      510     520     530     540     550
IBAer119-ahaC8  GTCCCGGCCGCCATCCCGCTGCGGGTGCCTGGAAAACGAGACCCCTGGCCCG
      560     570     580     590     600
IBAer119-ahaC8  GCGCTGGAGCGCCACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCG
      610     620     630     640     650
IBAer119-ahaC8  CGCTCAAAATCAGCCGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCCGGCGCAAC
      660     670     680     690     700
IBAer119-ahaC8  AACCTGGTGCTCTCCCAACAGGCGCCGCTGATGAAACCAACCCAGCTGCA

```

```

        660      670      680      690      700
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  CGACGCCGACAGCAAGGCTGCCAAGGCGCTGGCCAAGGCCAACGCCGGCA
                  710      720      730      740      750
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  ACAGGGTGTTCCTCGAATCGGACTTCAAGGCCGCGACGGCAAACGTCCCC
                  760      770      780      790      800
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  TGGCTGCCGGCCTGGGAGCCTGAGCAGGGTTACCTGCCGATCGGCGACGC
                  810      820      830      840      850
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  CCCGGTCAATCTGGGCGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGC
                  860      870      880      890      900
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  TGATCGTGCCGCAGGATCAGGTGATCACCGCCGGCGATCTGCTGCGCACC
                  910      920      930      940      950
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  AGCGACAACGACCGCCAGAGCGCCCCGGCCCGTGCCGACGGCACCGATCT
                  960      970      980      990      1000
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GCGCGTCGGCAGCTTCAACGTGCTCAACTACTTCACCAGCCACTCCAGCG
                  1010     1020     1030     1040     1050
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  TGGGCGGTGCCCTCAACGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGC
                  1060     1070     1080     1090     1100
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GCCAAGGGCTGCAACCGCGCGCCAAGAACC TGGAAGATTTCCAGAAACA
                  1110     1120     1130     1140     1150
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GCGCGCCAAGATCGTCAACGCCATCACCGAGATGGATGCCGACCTGCTCG
                  1160     1170     1180     1190     1200
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GCCTGATGGAGATGGAGAACCAACGGCTTTTGACAGCCACTCCGCCATCAGC
                  1210     1220     1230     1240     1250
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GACCTGGTGC AAGCCCTCAACGCCCAACAGAAAGAGGCGGGCAAGCAGTA
                  1260     1270     1280     1290     1300
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  CGCCTTCGTCAACCTGCCCCAAGGCGCTGCTGCAGGGCGAGCACTACTTCG
                  1310     1320     1330     1340     1350
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GTGGCGACGCCATCATGTGGCCATGATCTACCGGCCGGCCAAGCTGGCA
                  1360     1370     1380     1390     1400
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  CCGCAAGGGGACGCCAACGTCAATCACCCTGCCGGTG CAGAAATAC TTGGA
                  1410     1420     1430     1440     1450
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  TGCCAAAGGGGTGAGAAACAGGCCCTCTCAGCGTGACTCCCTGGTGCAGA
                  1460     1470     1480     1490     1500
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  CCTTCACCGTCGAGGGCAGCAAGGATCCGCTGACCC TGGTGGTCAACCAC
                  1510     1520     1530     1540     1550
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  CTGAAATCCAAGGGTT CAGGCTGCC TCGAGAACCTGGACGGCAAGGAGCC
                  1560     1570     1580     1590     1600
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  GGCCGATCTGCAGGGCAAGTG CACCGAGTTCCGGGT CAGTCCGCCAAGG
                  1610     1620     1630     1640     1650
    IBAer119-ahaC8  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                  TGCTGGGCGACGCGGTGAGCAAGCTGCCCGGCCAGGTGCTGCTGGTGGGC

```

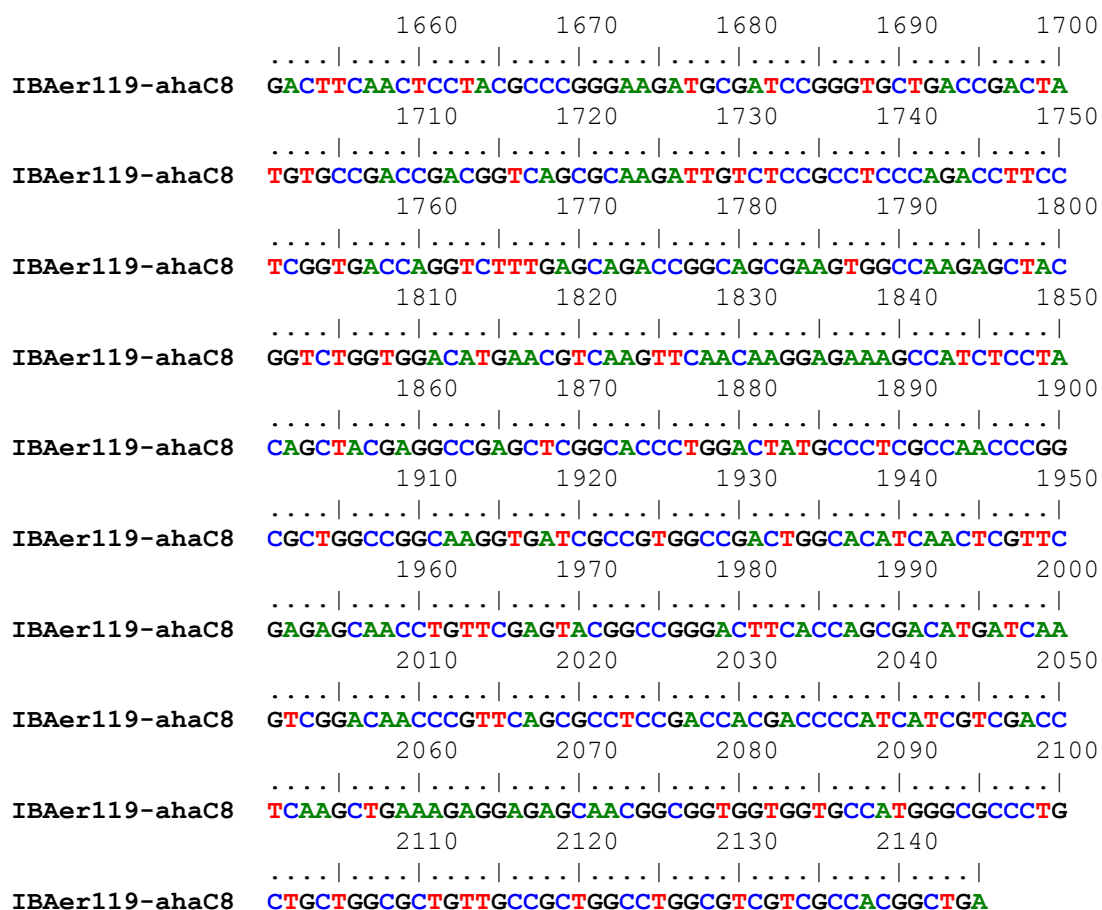


Figura 49. Sequência nucleotídica correspondente a ORF da DNase *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119. Nucleotídeos adenina (verde), timina (vermelho), citosina (azul) e guanidina (preto).

Com base no resultado do sequenciamento, uma busca por sequências nucleotídicas homólogas a ORF da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 foi realizada. Esta busca foi restrita a organismos do gênero *Aeromonas* e baseada nos bancos de dados *Nucleotide collection* (nr/nt) e *whole-genome shotgun contigs* (wgs), disponíveis no NCBI. Os resultados obtidos permitiram identificar diversas espécies de *Aeromonas* as quais apresentaram ORFs com elevado grau de homologia com a ORF da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119. Uma análise de agrupamento empregando o algoritmo *Neighbor-Joining* com um *bootstrap* de 2000 replicatas foi executado com base em algumas espécies de *Aeromonas* representativas do gênero. Conforme pode ser observado na Figura 50, um elevado grau de homologia foi evidenciado entre todas as

espécies de *Aeromonas* analisadas.

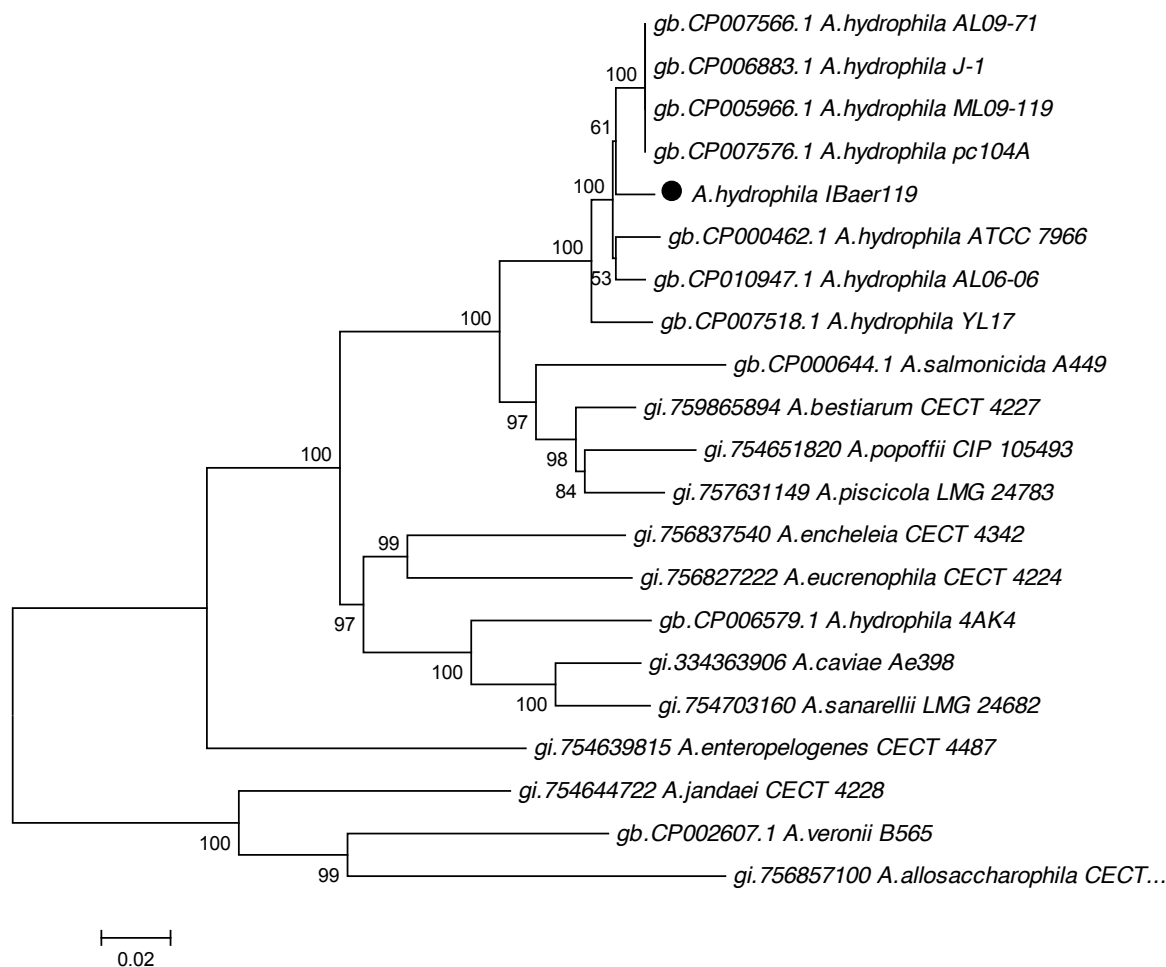


Figura 50. Análise de agrupamento (*Neighbor-Joining*) baseado na sequência nucleotídica de DNases Aha3441 em representantes do gênero *Aeromonas*. Círculo preto (●) indica a posição de *A. hydrophila* IBAer119, isolado empregado neste trabalho.

A análise de agrupamento evidencia que a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta uma grande semelhança em nível nucleotídico com a maioria das *A. hydrophila* avaliadas, especialmente com relação aos isolados ML09-119, AL09-71, pc104A, J-1, YL17, ATCC7966 e AL06-06. Apesar do elevado grau de similaridade, pequenas diferenças intraespecíficas podem ser observadas particularmente entre os representantes de *A. hydrophila*, uma vez que apenas o isolado 4AK4 se encontrou em um grupo distinto a aquele representado pela maioria dos isolados de *A. hydrophila*.

Considerando o elevado grau de similaridade em nível nucleotídico observado entre as diferentes espécies de *Aeromonas* avaliadas, assim como visto anteriormente para a DNase Dns, algumas sequências oriundas de genomas completamente sequenciados, excluindo por tanto as sequências provenientes de *shotgun contigs*, foram avaliadas com maiores detalhes.

Sendo assim, a análise comparativa da ORF correspondente a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 em relação às sequências nucleotídicas de *Aeromonas* obtidas a partir do banco de dados *Nucleotide collection* (nr/nt) disponíveis no NCBI, permitiu observar que o tamanho da ORF da DNase clonada a partir de *A. hydrophila* IBAer119 é idêntica aquela verificada para os isolados de *A. hydrophila* J-1, *A. hydrophila* pc104, *A. hydrophila* AL09-71, *A. hydrophila* ML09-119, *A. hydrophila* ATCC7966 e *A. hydrophila* YL17. Diferenças no tamanho foram observadas quando comparadas a ORF correspondente a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 em relação à ORF correspondente de *A. hydrophila* 4AK4, a qual, apresentou um tamanho de 2214 nt, cerca de 69 nt maior que a ORF da enzima clonada. Outra diferença no que se refere ao tamanho da ORF foi observada quando comparada a ORF da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 em relação às ORFs correspondentes de *A. salmonicida* A449 e *A. veronii* B565, as quais, apresentaram um tamanho de 2133 nt e 2190 nt, respectivamente. Estas diferenças representam ORFs 12 nt menor para *A. salmonicida* A449 e 45 nt maior para *A. veronii* B565 em relação à ORF da enzima clonada. Nenhuma outra espécie de *Aeromonas* depositada no banco de dados do NCBI apresentou sequências com homologia significativa em nível de nucleotídeos com a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119.

A partir destes resultados, uma nova avaliação foi realizada. A nova avaliação permitiu identificar que a ORF de *A. hydrophila* 4AK4 anotada com 2214 nt e

localizada originalmente posição 926064-928277, na verdade apresenta uma ORF de 2148 nt, e esta localizada na posição 926064-928211, com o start códon localizados cerca de 66 nt *downstream* a posição anotada originalmente. Para *A. salmonicida* A449 a ORF anotada com 2133 nt, localizada originalmente na posição 897218-899351, na verdade apresenta uma ORF de 2146 nt, localizada na posição 897218-899364, com um *start* códon localizado cerca de 13 nt *upstream* a posição anotada originalmente. Mesmo após as correções realizadas na sequência de *A. salmonicida* A449, um problema foi observado ao realizar a tradução da proteína com base na sequência nucleotídica corrigida. Este problema consistiu em um erro de leitura, gerando um *stop* códon após a tradução de 71 aa. Uma avaliação mais criteriosa foi realizada especificamente para esta sequência e permitiu identificar a presença de uma timina (T) na posição 141 do gene, aparentemente inexistente, a qual é responsável pelo erro no quadro de leitura da proteína.

Após esta avaliação os resultados obtidos mostram que em *A. salmonicida* A449 a ORF correspondente ao gene *aha3441* apresenta um tamanho de 2145 nt, sendo este idêntico a aquele observado para as linhagens de *A. hydrophila*. Desta forma, o conjunto de resultados observados para as linhagens de *A. hydrophila* 4AK4 e *A. salmonicida* A449 indicam, uma possível falha no sequenciamento ou na anotação para o gene correspondente a DNase *aha3441* nestas linhagens em particular.

A análise da sequência nucleotídica correspondente ao gene *aha3441* clonado a partir de *A. hydrophila* IBAer119 permitiu estabelecer sua composição nucleotídica, a qual, foi de GC=64,29% . Uma comparação entre os percentuais de GC em relação aos demais genes correspondentes a *aha3441* e provenientes de genomas completamente sequenciados são mostrados na Tabela 19.

A comparação entre isolados de *A. hydrophila* permitiu constatar que o

percentual de GC de *aha3441* variou de 64,29% (IBAer119 e ATCC7966) a 65,66% (4AK4). Já a comparação do percentual de GC do gene *aha3441* entre todas espécies de *Aeromonas* disponíveis permitiu constatar percentuais de GC de 61,60% para *A. salmonicida* A449 e 59,59% para *A. veronii* B565 (Tabela 19).

Tabela 19. Comparação entre a composição nucleotídica (GC) cobertura e identidade do gene correspondente a *aha3441* de *Aeromonas*

Espécies*	ORF**	Composição	Cobertura	Identidade	Referência/Acesso NCBI
		nucleotídica % GC			
<i>Ah</i> - IBAer119	2145nt	64,29	-	-	Estes estudo
<i>Ah</i> -J1	2145nt	64,85	100%	98%	NCBI (CP006883.1)
<i>Ah</i> -pc104A	2145nt	64,85	100%	98%	NCBI (CP007576.1)
<i>Ah</i> -AL09-71	2145nt	64,85	100%	98%	NCBI (CP007566.1)
<i>Ah</i> -ML09-119	2145nt	64,85	100%	98%	NCBI (CP005966.1)
<i>Ah</i> -ATCC7966	2145nt	64,29	100%	97%	NCBI (CP000462.1)
<i>Ah</i> -YL17	2145nt	64,52	100%	97%	NCBI (CP007518.1)
<i>Ah</i> -4AK4	2148nt	65,69	99%	84%	NCBI (CP006579.1)
<i>As</i> -A449	2145nt	61,63	99%	90%	NCBI (CP000644.1)
<i>Av</i> -B565	2190nt	59,59	57%	80%	NCBI (CP002607.1)

**Ah*- *Aeromonas hydrophila*, *As*-*Aeromonas salmonicida*, *Av*-*Aeromonas veronii*. ** ORFs corrigidas com base na análise de BLASTn.

A avaliação comparativa empregando BLASTn baseada na sequência nucleotídica do gene *aha3441* clonado a partir de *A. hydrophila* IBAer119 em relação às sequências nucleotídicas correspondentes a genes homólogos de *Aeromonas*, depositadas no banco de dados *Nucleotide collection* (nr/nt) do NCBI foi realizada (Tabela 19). A comparação entre as sequências nucleotídicas do gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119 em relação à outras *A. hydrophila*, permitiram constatar identidades variando de 84% (4AK4) a 98% (J1, pc104A, AL09-71 e ML09-119). Já quando as sequências nucleotídicas do gene *aha3441* foram comparadas as sequências das demais espécies de *Aeromonas*, as identidades foram de 90% para *A. salmonicida* A449 e 80% para *A. veronii* B565 (Tabela 19). Após a avaliação de BLASTn, as

sequências nucleotídicas obtidas a partir da busca no banco de dados do NCBI foram submetidas à análise de alinhamento empregando o programa BioEdit 7.0 (ANEXO III).

De acordo com os resultados observados no ANEXO III, uma menor homologia a nível nucleotídico é observada na região inicial do gene (entre 70-230 nt), com diferenças observadas para a linhagem de *A. veronii* B565, a qual apresentou uma deleção de três nucleotídeos entre as posições 72-75 seguidas por múltiplas inserções variando de um a oito nucleotídeos entre as posições 100-229. Outra diferença foi observado entre as posições 450-457, caracterizada pela inserção de seis nucleotídeos em *A. veronii* B565. Além disso, uma deleção de três nucleotídeos foi observada entre as posições 1433-1436 para as linhagens de *A. hydrophila* 4AK4 e *A. veronii* B565. Uma inserção de três nucleotídeos foi constatada entre as posições 1581-1585, novamente para as linhagens de *A. hydrophila* 4AK4 e *A. veronii* B565. A maior inserção (15nt) foi observada para *A. veronii* B565 entre as posições 2115-2131. Estas variações indicam a existência de uma diversidade em nível nucleotídico para o gene *aha3441* entre as diferentes espécies de *Aeromonas* avaliadas, mas principalmente em relação a *A. veronii* B565.

A partir da sequência obtida através de sequenciamento do gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119, foi possível deduzir sua sequência de aminoácidos correspondente. Conforme pode ser observado na figura 51, a ORF correspondente ao gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119 apresentou uma proteína constituída por 714aa com uma massa molecular teórica de 77137,25 Da, estimada empregando as ferramentas disponíveis no ambiente virtual ExPasy.

1	ATG AAA GGA ACA CGT ACC CTG CTG TCG CTG GCC GTG GGG CTT GCG	45
1	Met Lys Gly Thr Arg Thr Leu Leu Ser Leu Ala Val Gly Leu Ala	15
46	CTC GCC TCC CCG TCC GTC TAT GCA GCC GGC TTC AGC TGC CCG GCC	90
16	Leu Ala Ser Pro Ser Val Tyr Ala Ala Gly Phe Ser Cys Pro Ala	30
91	GAC AGC GCC CTC ACC CCG ATC CCG GTC ATT CAG GGC AGC GGC GAC	135
31	Asp Ser Ala Leu Thr Pro Ile Pro Val Ile Gln Gly Ser Gly Asp	45
136	AAG AGC CCG CTC ATT CCC GCC GAC AAG TTC GAA AGC CCC CAG AGT	180
46	Lys Ser Pro Leu Ile Pro Ala Asp Lys Phe Glu Ser Pro Gln Ser	60
181	GTC ATG GTC AAG GCA GTG GTC TCT GGC CTT GGC GAG AGC CTC AAC	225
61	Val Met Val Lys Ala Val Val Ser Gly Leu Gly Glu Ser Leu Asn	75
226	AAA GGG TTC TAC CTG CTG GAT GTG CAG GGA GAC GGC AAC CCC CAG	270
76	Lys Gly Phe Tyr Leu Leu Asp Val Gln Gly Asp Gly Asn Pro Gln	90
271	ACC TCG GAC GGC ATC TTC GTC TTC CTG AAC GAC AAG AAC TTC GCC	315
91	Thr Ser Asp Gly Ile Phe Val Phe Leu Asn Asp Lys Asn Phe Ala	105
316	AGC AAG TAC CCG GAC ATC AAG CCG GGT GCC GAA GTC TGC CTG GAG	360
106	Ser Lys Tyr Pro Asp Ile Lys Pro Gly Ala Glu Val Cys Leu Glu	120
361	GCC AAG GTC GAG GAG TAT TAC AAC CAC ACC CAG CTC AAG CCG GTG	405
121	Ala Lys Val Glu Glu Tyr Tyr Asn His Thr Gln Leu Lys Pro Val	135
406	TTT GAC AGC GGT ACC CCG CGC CTG CAG GTC GTC GCC CAG GGC TCG	450
136	Phe Asp Ser Gly Thr Pro Arg Leu Gln Val Val Ala Gln Gly Ser	150
451	GTC CCG GCC GCC ATC CCG CTG CGG GTG CTG GAA AAC GAG ACC CTG	495
151	Val Pro Ala Ala Ile Pro Leu Arg Val Leu Glu Asn Glu Thr Leu	165
496	GCC CGG GCG CTG GAG CGC CAC GAA GGG ATG CGG GTA CGG CTC GAT	540
166	Ala Arg Ala Leu Glu Arg His Glu Gly Met Arg Val Arg Leu Asp	180
541	GCC GAC AGC GCG CTC AAA ATC AGC CGC AAC TTC AGC TAC GAC TAC	585
181	Ala Asp Ser Ala Leu Lys Ile Ser Arg Asn Phe Ser Tyr Asp Tyr	195
586	GCC GCC CGG CGC AAC AAC CTG GTG CTC TCC CAC CAG GCG CCG CTG	630
196	Ala Ala Arg Arg Asn Asn Leu Val Leu Ser His Gln Ala Pro Leu	210
631	ATG AAA CCA ACC CAG CTG CAC GAC GCC GAC AGC AAG GCT GCC AAG	675
211	Met Lys Pro Thr Gln Leu His Asp Ala Asp Ser Lys Ala Ala Lys	225
676	GCG CTG GCC AAG GCC AAC GCC GGC AAC AGG GTG TTC CTC GAA TCG	720
226	Ala Leu Ala Lys Ala Asn Ala Gly Asn Arg Val Phe Leu Glu Ser	240
721	GAC TTC AAG GCC GCC GAC GGC AAA CTG CCC TGG CTG CCG GCC TGG	765
241	Asp Phe Lys Ala Ala Asp Gly Lys Leu Pro Trp Leu Pro Ala Trp	255
766	GAG CCT GAG CAG GGT TAC CTG CGC ATC GGC GAC GCC CCG GTC AAT	810
256	Glu Pro Glu Gln Gly Tyr Leu Arg Ile Gly Asp Ala Pro Val Asn	270
811	CTG GGC GCC ATG GTG GGC TAC AGC TAC AAC GAG TAC CGG CTG ATC	855
271	Leu Gly Ala Met Val Gly Tyr Ser Tyr Asn Glu Tyr Arg Leu Ile	285
856	GTG CCG CAG GAT CAG GTG ATC ACC GCC GGC GAT CTG CTG CGC ACC	900
286	Val Pro Gln Asp Gln Val Ile Thr Ala Gly Asp Leu Leu Arg Thr	300
901	AGC GAC AAC GAC CGC CAG AGC GCC CCG GCC CGT GCC GAC GGC ACC	945
301	Ser Asp Asn Asp Arg Gln Ser Ala Pro Ala Arg Ala Asp Gly Thr	315
946	GAT CTG CGC GTC GGC AGC TTC AAC GTG CTC AAC TAC TTC ACC AGC	990
316	Asp Leu Arg Val Gly Ser Phe Asn Val Leu Asn Tyr Phe Thr Ser	330
991	CAC TCC AGC GTG GGC GGT GCC CTC AAC GTG CTG TGC AAG GAT CAG	1035
331	His Ser Ser Val Gly Gly Ala Leu Asn Val Leu Cys Lys Asp Gln	345

1036	GCG GAT GCG GAC AGC GCC AAG GGC TGC AAC CGC GGC GCC AAG AAC	1080
346	Ala Asp Ala Asp Ser Ala Lys Gly Cys Asn Arg Gly Ala Lys Asn	360
1081	CTG GAA GAT TTC CAG AAA CAG CGC GCC AAG ATC GTC AAC GCC ATC	1125
361	Leu Glu Asp Phe Gln Lys Gln Arg Ala Lys Ile Val Asn Ala Ile	375
1126	ACC GAG ATG GAT GCC GAC CTG CTC GGC CTG ATG GAG ATG GAG AAC	1170
376	Thr Glu Met Asp Ala Asp Leu Leu Gly Leu Met Glu Met Glu Asn	390
1171	AAC GGC TTT GAC AGC CAC TCC GCC ATC AGC GAC CTG GTG CAA GCC	1215
391	Asn Gly Phe Asp Ser His Ser Ala Ile Ser Asp Leu Val Gln Ala	405
1216	CTC AAC GCC CAA CAG AAA GAG GCG GGC AAG CAG TAC GCC TTC GTC	1260
406	Leu Asn Ala Gln Gln Lys Glu Ala Gly Lys Gln Tyr Ala Phe Val	420
1261	ACC CTG CCC AAG GCG CTG CTG CAG GGC GAG CAC TAC TTC GGT GGC	1305
421	Thr Leu Pro Lys Ala Leu Leu Gln Gly Glu His Tyr Phe Gly Gly	435
1306	GAC GCC ATC ATG GTG GCC ATG ATC TAC CGG CCG GCC AAG CTG GCA	1350
436	Asp Ala Ile Met Val Ala Met Ile Tyr Arg Pro Ala Lys Leu Ala	450
1351	CCG CAA GGG GAC GCC AAC GTC ATC ACC CTG CCG GTG CAG AAA TAC	1395
451	Pro Gln Gly Asp Ala Asn Val Ile Thr Leu Pro Val Gln Lys Tyr	465
1396	TTG GAT GCC AAA GGG GTC GAG AAA CAG GCC TCT CAG CGT GAC TCC	1440
466	Leu Asp Ala Lys Gly Val Glu Lys Gln Ala Ser Gln Arg Asp Ser	480
1441	CTG GTG CAG ACC TTC ACC GTC GAG GGC AGC AAG GAT CCG CTG ACC	1485
481	Leu Val Gln Thr Phe Thr Val Glu Gly Ser Lys Asp Pro Leu Thr	495
1486	CTG GTG GTC AAC CAC CTG AAA TCC AAG GGT TCA GGC TGC CTC GAG	1530
496	Leu Val Val Asn His Leu Lys Ser Lys Gly Ser Gly Cys Leu Glu	510
1531	AAC CTG GAC GGC AAG GAG CCG GCC GAT CTG CAG GGC AAG TGC ACC	1575
511	Asn Leu Asp Gly Lys Glu Pro Ala Asp Leu Gln Gly Lys Cys Thr	525
1576	GAG TTC CGG GTC AGT GCC GCC AAG GTG CTG GGC GAC GCG GTG AGC	1620
526	Glu Phe Arg Val Ser Ala Ala Lys Val Leu Gly Asp Ala Val Ser	540
1621	AAG CTG CCC GGC CAG GTG CTG CTG GTG GGC GAC TTC AAC TCC TAC	1665
541	Lys Leu Pro Gly Gln Val Leu Leu Val Gly Asp Phe Asn Ser Tyr	555
1666	GCC CGG GAA GAT GCG ATC CGG GTG CTG ACC GAC TAT GTG CCG ACC	1710
556	Ala Arg Glu Asp Ala Ile Arg Val Leu Thr Asp Tyr Val Pro Thr	570
1711	GAC GGT CAG CGC AAG ATT GTC TCC GCC TCC CAG ACC TTC CTC GGT	1755
571	Asp Gly Gln Arg Lys Ile Val Ser Ala Ser Gln Thr Phe Leu Gly	585
1756	GAC CAG GTC TTT GAG CAG ACC GGC AGC GAA GTG GCC AAG AGC TAC	1800
586	Asp Gln Val Phe Glu Gln Thr Gly Ser Glu Val Ala Lys Ser Tyr	600
1801	GGT CTG GTG GAC ATG AAC GTC AAG TTC AAC AAG GAG AAA GCC ATC	1845
601	Gly Leu Val Asp Met Asn Val Lys Phe Asn Lys Glu Lys Ala Ile	615
1846	TCC TAC AGC TAC GAG GCC GAG CTC GGC ACC CTG GAC TAT GCC CTC	1890
616	Ser Tyr Ser Tyr Glu Ala Glu Leu Gly Thr Leu Asp Tyr Ala Leu	630
1891	GCC AAC CCG GCG CTG GCC GGC AAG GTG ATC GCC GTG GCC GAC TGG	1935
631	Ala Asn Pro Ala Leu Ala Gly Lys Val Ile Ala Val Ala Asp Trp	645
1936	CAC ATC AAC TCG TTC GAG AGC AAC CTG TTC GAG TAC GGC CGG GAC	1980
646	His Ile Asn Ser Phe Glu Ser Asn Leu Phe Glu Tyr Gly Arg Asp	660
1981	TTC ACC AGC GAC ATG ATC AAG TCG GAC AAC CCG TTC AGC GCC TCC	2025
661	Phe Thr Ser Asp Met Ile Lys Ser Asp Asn Pro Phe Ser Ala Ser	675

```

2026 GAC CAC GAC CCC ATC ATC GTC GAC CTC AAG CTG AAA GAG GAG AGC 2070
676 Asp His Asp Pro Ile Ile Val Asp Leu Lys Leu Lys Glu Glu Ser 690

2071 AAC GGC GGT GGT GGT GCC ATG GGC GCC CTG CTG CTG GCG CTG TTG 2115
691 Asn Gly Gly Gly Gly Ala Met Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu 705

2116 CCG CTG GCC TGG CGT CGT CGC CAC GGC TGA 2145
706 Pro Leu Ala Trp Arg Arg Arg His Gly End

```

Figura 51. Sequência de aminoácidos (aa), deduzida a partir da ORF do gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119.

Considerando que a DNase Aha3441 apresenta uma localização extracelular, uma busca visando identificar a região correspondente à sequência líder (peptídeo sinal) foi realizada utilizando o programa SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Os resultados obtidos indicam a presença de um peptídeo sinal de 23aa (D score=0,921) com um sítio de clivagem entre as posições 23 e 24 gerando uma proteína madura de 691aa com uma massa molecular teórica de 74835,47 Da.

A análise comparativa visando identificar os peptídeos sinais nas demais proteínas homólogas a Aha3441 em *Aeromonas* foi realizada (Tabela 20).

Tabela 20. Sequências de peptídeo sinal, posição de clivagem, D score e proteína Aha3441 madura de *Aeromonas*. ↓ indica o ponto de clivagem.

Espécie*	Sequência	Posição de clivagem	D. score SignalP	Proteína madura
Ah- IBAer119	MKGTRTLLSLAVGLALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,921	691aa
Ah- J1	MKGTRTLLSLAVGLALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,921	691aa
Ah- pc104A	MKGTRTLLSLAVGLALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,921	691aa
Ah-AL09-71	MKGTRTLLSLAVGLALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,921	691aa
Ah-ML09-119	MKGTRTLLSLAVGLALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,921	691aa
Ah-ATCC7966	MKGTRTLLSLAVGLALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,921	691aa
Ah-YL17	MKGTRTLLSLAVGIALASPSVYA ↓ AGFSCPA	23-24	0,902	691aa
Ah-4AK4	MKGRPTLLSLAVGLALASPSLHA ↓ AGFSCPA	23-24	0,916	692aa
As-A449	MKGTRALLSLAVGLALASPSVHA ↓ ASFSCPA	23-24	0,928	691aa
Av-B565	MKGTRTLLSLAVGLALASSGAHA ↓ AFVCPD	23-24	0,943	706aa

* Ah- *Aeromonas hydrophila*, As-*Aeromonas salmonicida*, Av-*Aeromonas veronii*.

Conforme pode ser observado na Tabela 20, todas as *Aeromonas* analisada apresentaram um peptídeo sinal para a DNase Aha3441 com tamanho de 23aa. No entanto, diferenças no tamanho da proteína Aha3441 madura foram observadas para as linhagens de *A. hydrophila* 4AK4 e *A. veronii* B565 com tamanhos de 692aa e 706aa, respectivamente. Assim como visto anteriormente para a DNase Dns, a presença de peptídeos sinal para a DNase Aha3441 indica que esta proteína é secretada por meio de um sistema Sec-dependente, o qual emprega uma translocase para realizar o transporte através da membrana citoplasmática (Tomás, 2012).

A análise comparativa da DNase Aha3441 madura de IBAer119 foi realizada empregando a ferramenta BLASTp com base no banco de dados *Non-redundant protein sequence* (nr), disponível no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). A comparação entre a DNase Aha3441 madura de *A. hydrophila* IBAer119 e as proteínas homologas representativas de bactérias do gênero *Aeromonas* revelou identidades variando entre 66 e 99%, e positivities variando de 78 a 99%. Considerando apenas as espécies representativas de *A. hydrophila*, a menor identidade (82%) e positividade (89%) foi observada para a proteína correspondente a linhagem 4AK4 (Tabela 21).

Tabela 21. Comparação da proteína Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 com relação a seus homólogos em *Aeromonas*.

Espécie*	Identidade	Positividade	E value	Referência (NCBI)
Ah- IBAer119	100%	100%	0.0	-
Ah-J1	99%	99%	0.0	AJE35162.1
Ah-pc104A	99%	99%	0.0	AHX70859.1
Ah-AL09-71	99%	99%	0.0	AHX34058.1
Ah-ML09-119	99%	99%	0.0	AGM45435.1
Ah-ATCC7966	99%	98%	0.0	YP857930.1
Ah-YL17	98%	98%	0.0	AHV34042.1
Ah-4AK4	82%	89%	0.0	AHE48385.1
As-A449	91%	95%	0.0	ABO89007.1
Av-B565	66%	78%	0.0	AEB48891.1

* Ah- *Aeromonas hydrophila*, As-*Aeromonas salmonicida*, Av-*Aeromonas veronii*.

Elevados índices de identidade e positividade foram constatados para a proteína Aha3441 correspondente a linhagem de *A. salmonicida* A449, com valores de identidade de 91% e positividade de 95%. A menor identidade e positividade foram observadas quando a enzima madura Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 foi comparada a seu homólogo em *A. veronii* B565, com valores de identidade e positividade de 66% e 78%, respectivamente (Tabela 21).

A análise de BLASTp permitiu identificar que a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta domínios conservados pertencentes à super família Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase (EEP), a qual inclui domínios catalíticos de diversos conjuntos de proteínas incluindo representantes da família ExoIII apurínica/apirimidinica (AP) endonuclease, inositol fosfolipase 5-fosfatase (INPP5), neutral esfingomielinase (nSMases), deadenilase (tais como aquelas em vertebrados envolvidas na regulação do relógio circadiano noturno), toxina B citotética bacteriana distendida (CdtB), desoxiribonuclease 1 (DNase I), um domínio de endonuclease non-LTR retrotransposon LINE-1, além de outros domínios relacionados.

Estas diversas enzimas apresentam um mecanismo em comum de clivagem catalítica de ligações fosfodiésteres e seus substratos variam de ácidos nucleicos, fosfolipídios e eventualmente proteínas. Aha3441 apresenta ainda um *non-specific hits* característico de *Mycoplasma pulmonis* MnuA, uma nuclease associada à membrana e relacionada a desoxiribonuclease I (DNase I - EC. 3.1.21.1), cujo papel *in vivo* permanece indeterminado. Os domínios conservados relativos à MnuA estão representados por quadrantes contínuos na Figura 53. Além disso, a análise de domínios conservados permitiu observar a presença de um domínio YhcR-OBF-like, o qual pertence à subfamília de domínios OB *folds*, similar àqueles observados em *Bacillus subtilis*. YhcR consiste em uma nuclease açúcar não específica a qual é ativa na

presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} e cliva RNA com ação endonucleásica gerando nucleosídeos 3' monofosfatos. Em *Bacillus subtilis* YhcR parece ser ativada preferencialmente por Ca^{2+} e sua localização pode estar associada à parede celular (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Os domínios conservados relativos à YhcR-OBF-Like estão representados por quadrantes tracejados na Figura 52.

O alinhamento entre a proteína Aha3441 madura de *A. hydrophila* IBAer119 em relação às proteínas homologas dos representantes de *Aeromonas* foi realizado empregando o programa BioEdit 7.0 (Figura 52). Os resultados obtidos revelaram a presença de regiões altamente conservadas entre todos os representantes de *Aeromonas* avaliados. No entanto, diferenças marcantes foram constatadas entre as posições 39-49 e 674-680 exclusivas para proteína alinhada de *A. veronii* B565. Estas diferenças foram caracterizadas pelas inserções de nove aminoácidos (Gly-Lys-Ile-Ser-Thr-Gly-Thr-Phe-Asn) entre as posições 39-49, e cinco aminoácidos (Glu-Ser-Asp-Ala-Thr) entre as posições 674-680 (Figura 52).

A análise de predição da estrutura secundária (Figura 52), foi realizada empregando PROMALS *web server* (Pei & Grishin, 2007) e DALI *web server* (Holm & Rosenström, 2010).

A análise de predição da estrutura secundária de Aha3441 permitiu identificar a presenças de 11 regiões correspondentes a α -hélices e 30 regiões correspondentes a β -folhas (Figura 52). Conforme pode ser observado na análise de predição, com exceção das regiões β 3 e β 7, todas as demais alterações observadas se encontram em regiões preditas como *coils* indicando desta forma, que tais modificações provavelmente não afetam a funcionalidade da proteína Aha3441. Além disso, a análise permitiu identificar 6 resíduos de cisteína altamente conservados entre as diferentes espécies de *Aeromonas* avaliadas, sugerindo a existência de pontes dissulfeto, as quais provavelmente são

importantes para a correta conformação da proteína.

Conservation:	9395995955599999399939159593533355535593555555559	
AEB48891.1-A_veronii_B565	1 -AFVCPSPDAQLTPIPTIQGTGSASALATQTVTDKNGNVTKISTGTNNV	49
ABO98007.1-A_salmonicida A449	1 ASFSCPADSA-LTPIPVIIQGGIGKSPILPDGKFESQSVT-----	40
AHV34042.1-A_hydrophila YL17	1 AGFSCPADSD-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
YP857930.1-A_hydrophila ATCC7966	1 AGFSCPADSA-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
AGM45435.1-A_hydrophila ML09-119	1 AGFSCPADSA-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
AHX34058.1-A_hydrophila AL09-71	1 AGFSCPADSA-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
AHX70859.1-A_hydrophila pc104A	1 AGFSCPADSA-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
AJE351662.1-A_hydrophila J1	1 AGFSCPADSA-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
A.hydrophila_IBAer119	1 AGFSCPADSA-LTPIPVIIQSGDGKSPILPADKFESQSVM-----	40
AHE48385.1-A_hydrophila 4AK4	1 AGFSCPADSA-LTPIPAIQSGGHKSPVPDDQFESQSVS-----	40
Consensus_ss:	eeeeee eeeeeee eee	
	β1 β2	
Conservation:	5559539959555999393599599999995999395559959559	
AEB48891.1-A_veronii_B565	50 RGIVTTTLGQSLTKGYFYLIDPVGDGNEHTSDGIFVYLNNDKDFATKYKDVKP	99
ABO98007.1-A_salmonicida A449	41 KAVVTALGESLNKGFFYLIDLGDDNPGTSDGIFVYLNNDKNFASKYEDIKP	90
AHV34042.1-A_hydrophila YL17	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLSDKNFTSKYEDIKP	90
YP857930.1-A_hydrophila ATCC7966	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
AGM45435.1-A_hydrophila ML09-119	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
AHX34058.1-A_hydrophila AL09-71	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
AHX70859.1-A_hydrophila pc104A	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
AJE351662.1-A_hydrophila J1	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
A.hydrophila_IBAer119	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
AHE48385.1-A_hydrophila 4AK4	41 KAVVSGLGESLNKGFFYLIDVQGDGNEHTSDGIFVFLNDKNFASKYEDIKP	90
Consensus_ss:	eeeeee eeee eeeee eeeee e	
	β3 β4 β5	
Conservation:	95359999595555995995933913555559591999505955359595	
AEB48891.1-A_veronii_B565	100 GSKVLEACVQFFYCGTQLTETVVDKATKKAHLQVTAQGLNVPTSV-LQVN	148
ABO98007.1-A_salmonicida A449	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-SVPAAVPLRVL	137
AHV34042.1-A_hydrophila YL17	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPMTDNGT--ARLQVLAQG-TAPAAIPLRVL	137
YP857930.1-A_hydrophila ATCC7966	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-AVPAIPLRVL	137
AGM45435.1-A_hydrophila ML09-119	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-SVPAAIPLRVL	137
AHX34058.1-A_hydrophila AL09-71	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-SVPAAIPLRVL	137
AHX70859.1-A_hydrophila pc104A	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-SVPAAIPLRVL	137
AJE351662.1-A_hydrophila J1	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-SVPAAIPLRVL	137
A.hydrophila_IBAer119	91 GAELVLEAKVEEYYNHTQIKPVFDSGT--PRLQVLAQG-SVPAAIPLRVL	137
AHE48385.1-A_hydrophila 4AK4	91 GALLVLEAKVEEYHGTQIKPVFDSGA--PRLQVLAQG-DAPATAIPLRVL	137
Consensus_ss:	eeeee eeee eeee ee ee	
	β6 β7 β8 β9	
Conservation:	959999599599999999999339395359955599553999559953599	
AEB48891.1-A_veronii_B565	149 EGETLAQALNRHEGMRVRLDSSSDLHLTRNNGFYDYKVRNNVLAHKTP	198
ABO98007.1-A_salmonicida A449	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSTLKVSRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
AHV34042.1-A_hydrophila YL17	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
YP857930.1-A_hydrophila ATCC7966	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
AGM45435.1-A_hydrophila ML09-119	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
AHX34058.1-A_hydrophila AL09-71	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
AHX70859.1-A_hydrophila pc104A	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
AJE351662.1-A_hydrophila J1	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
A.hydrophila_IBAer119	138 ENETLARALERHEGMRVRLDADSAALKISRNFSYDYAARRNNVLVSHQAPL	187
AHE48385.1-A_hydrophila 4AK4	138 EGETLARALERHEGMRVRLDGESALKVSRNFSYDYAARRNNVLVLAHGAPL	187
Consensus_ss:	hhhhhhh eeeee eeeee eeeee	
	α1 β10 β11 β12	
Conservation:	59999993939339599915933995559995995595999593955599	
AEB48891.1-A_veronii_B565	199 IKPTQLHVANSADAVLATKNGSNRLVVEESDYKAPDGLVPWFPSWDADQG	248
ABO98007.1-A_salmonicida A449	188 MKPTQLHAADSKEAKALARANARNRVFLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
AHV34042.1-A_hydrophila YL17	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
YP857930.1-A_hydrophila ATCC7966	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
AGM45435.1-A_hydrophila ML09-119	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
AHX34058.1-A_hydrophila AL09-71	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
AHX70859.1-A_hydrophila pc104A	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
AJE351662.1-A_hydrophila J1	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
A.hydrophila_IBAer119	188 MKPTQLHDADSKAAKALAKANAGNRVLESDFKAADGKLPWLPWPEQ	237
AHE48385.1-A_hydrophila 4AK4	188 MKPTQLHVAGSPEAVALEANAGNRVLESDFKAANGKLPWLPWPEQ	237
Consensus_ss:	hhhhhhh eee	
	α2 β13	

Conservation:			99999955559353559555559959939515999599953559993599																																															
AEB48891.1-A_veronii_B565	249	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	L	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
ABO98007.1-A_salmonicida_A449	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	L	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
AHV34042.1-A_hydrophila_YL17	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
YP857930.1-A_hydrophila_ATCC7966	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	E	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	T	P	A
AGM45435.1-A_hydrophila_ML09-119	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
AHX34058.1-A_hydrophila_AL09-71	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
AHX70859.1-A_hydrophila_pc104A	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
AJE351662.1-A_hydrophila_J1	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	D	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
A.hydrophila_IBAer119	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	G	A	M	V	G	S	Y	N	E	Y	R	L	I	V	P	Q	D	Q	V	I	T	A	G	D	L	L	R	T	S	D	N	D	R	Q	S	A		
AHE48385.1-A_hydrophila_4AK4	238	Y	L	R	I	G	D	A	P	V	N	L	E	A	L	V	G	S	Y	D	E	Y	R	L	I	V	P	K	D	Q	R	I	T	A	G	D	L	L	R	T	D	E	N	D	R	Q	G	A		
Consensus_ss:		ee		ee		eeeeeeee				eeeeee																																								
		β14		β15		β16				β17																																								

[illegible]

Conservation:

AEB48891.1-A_veronii_B565	349	QPEFEKQRTKIINAIITAMDADLLGLIMEMENNGFEDNSALHNLVTRINEQQ	398
ABO98007.1-A_salmonicida_A449	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQSINAQQ	387
AHV34042.1-A_hydrophila_YL17	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAIALNAAQ	387
YP857930.1-A_hydrophila_ATCC7966	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAINAQQ	387
AGM45435.1-A_hydrophila_ML09-119	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAINAQQ	387
AHX34058.1-A_hydrophila_AL09-71	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAINAQQ	387
AHX70859.1-A_hydrophila_pc10A	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAINAQQ	387
AJE351662.1-A_hydrophila_J1	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAINAQQ	387
A.hydrophila_IBAer119	338	LDFDQKQRAKIVNAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDSSHSAISDLVQAINAQQ	387
AHE48385.1-A_hydrophila_4AK4	338	LEEFQLQRTKHVNIAIITEMDADLLGLIMEMENNGFDEHAASIDLVQSINARQ	387
Consensus_ss:		hhhhhhhnhhhhhhhhhhhhhhhhhheeeeeeeehhhhhhhhnhhhhh	
		α4 β19 α5	

Conservation: 9593959959199553933535999999999599995959599939939

AEB48891.1-A_veronii_B565	399	KDASKHYAYVRLPVLTALTDGKFFGGDAIMVAMIYRPAILLTPSGDASVIKL	448
ABO98007.1-A_salmonicida_A449	388	KEADKQYAFVALPKARLGDERFFGGDAIMVAMIYRPAILLTPCGDASVITL	437
AHV334042.1-A_hydrophila_YL17	388	KEAGKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLTPCGDANVITL	437
YP857930.1-A_hydrophila_ATCC7966	388	KEADKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLTPCGDANVITL	437
AGM45435.1-A_hydrophila_ML09-119	388	KEAGKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLAPCGDANVITL	437
AHX34058.1-A_hydrophila_AI09-71	388	KEAGKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLAPCGDANVITL	437
AHX70859.1-A_hydrophila_pc104A	388	KEAGKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLAPCGDANVITL	437
AJE351662.1-A_hydrophila_J1	388	KEAGKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLAPCGDANVITL	437
A.hydrophila_IBAer119	388	KEAGKQYAFVTLTPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLLAPCGDANVITL	437
AHE48385.1-A_hydrophila_4AK4	388	KEASKQYAFVSLPKALLTQERFFGGDAIMVAMIYRPAILLTPSGDAEVIRL	437
Consensus_ss:		h eeee eeee eee eee	
		820 821 822 823	

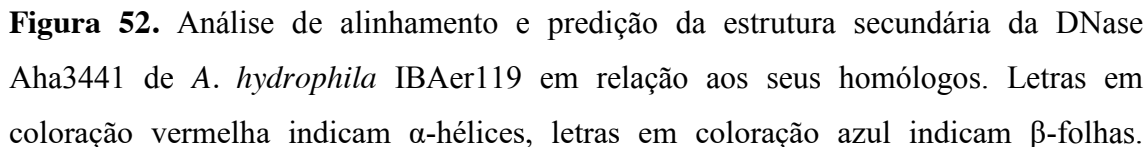
Conservation:

AEB48891.1-A_veronii_B565	449	PEQRYTTG-GVAKTAGQRD	SLVQTFTLAKSKEPLTLTV	NHLKSKSGSGYE	497
ABO98007.1-A_salmonicida_A449	438	PVQKYQDAKGVEKQASQRD	SLVQSFTTVEGSKEPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
AHV34042.1-A_hydrophila_YL17	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
YP857930.1-A_hydrophila_ATCC7966	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
AGM45435.1-A_hydrophila_ML09-119	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
AHX34058.1-A_hydrophila_AI09-71	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
AHX70859.1-A_hydrophila_pc104A	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
AJE351662.1-A_hydrophila_J1	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
A.hydrophila_IBAer119	438	PVQKYLDAAKGVEKQASQRD	SLVQTFTTVEGSKDPLTLTV	NHLKSKSGSGCLE	487
AHE48385.1-A_hydrophila_4AK4	438	PEQRYITG-GVARSAQRD	SLVRQFGVAGSDPEPLTLTV	NHLKSKSGSGYE	486

Consensus_ss:

leeeeeee eeee | eeee |

824 825



Quadrantes contínuos indicam domínios conservador correspondentes a nuclease MnuA (EEP) de *Mycoplasma pulmonis*. Quadrantes tracejados indicam domínios conservador correspondentes a YhcR-OBF-Like. Números na parte superior das sequências indicam o nível de conservação de cada aminoácido. Os resíduos conservados de cisteína estão grifados em coloração amarela.

A análise de predição da estrutura secundária de Aha3441 permitiu identificar a presenças de 11 regiões correspondentes a α -hélices e 30 regiões correspondentes a β -folhas (Figura 52). Conforme pode ser observado na análise de predição, com exceção das regiões β 3 e β 7, todas as demais alterações observadas se encontram em regiões preditas como *coils* indicando desta forma, que tais modificações provavelmente não afetam a funcionalidade da proteína Aha3441. Além disso, a análise permitiu identificar 6 resíduos de cisteína altamente conservados entre as diferentes espécies de *Aeromonas* avaliadas, sugerindo a existência de pontes dissulfeto, as quais provavelmente são importantes para a correta conformação da proteína.

Uma nova análise empregando BLASTp foi realizada visando comparar a sequência de aminoácidos da proteína Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 com outras proteínas de *Aeromonas* e surpreendentemente permitiu observar que a enzima Aha3441 apresenta certo grau de homologia com outra nuclease presente neste gênero bacteriano descrita como Nuc, a qual apresenta um tamanho de 1072 aa. A análise de BLASTp comparando a enzima Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 em relação à enzima Nuc permitiu identificar identidades e positivities variando entre 47-49% e 61-63%, respectivamente, em diversas espécies de *Aeromonas* (Tabela 22).

Tabela 22. Análise comparativa entre a DNase Aha 3441 de *A. hydrophila* IBAer119 e a DNase Nuc de diferentes espécies de *Aeromonas*.

Espécie	Cobertura	Ident.	Posit.	E value	Referência (NCBI)
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	100%	100%	100%	0.0	-
<i>A. bestiarum</i>	64%	49%	63%	0.0	WP 043555630.1
<i>A. bivalvium</i>	61%	47%	61%	0.0	WP 041997062.1
<i>A. caviae</i>	62%	49%	62%	0.0	WP 039039123.1
<i>A. diversa</i>	61%	48%	61%	0.0	WP 043598038.1
<i>A. encheleia</i>	62%	48%	62%	0.0	WP 042654783.1
<i>A. hydrophila</i> AL09-71	65%	49%	63%	0.0	AHX 32875.1
<i>A. hydrophila</i> J1	65%	49%	63%	0.0	AJE 36284.1
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	64%	49%	63%	0.0	YP 856704.1
<i>A. hydrophila</i> ML09-119	65%	49%	63%	0.0	AGM 44204.1
<i>A. hydrophila</i> pc104A	65%	49%	63%	0.0	AHX 69673.1
<i>A. hydrophila</i> YL17	64%	49%	63%	0.0	AHV 35117.1
<i>A. piscicola</i>	64%	49%	62%	0.0	WP 042871862.1
<i>A. popoffii</i>	67%	48%	62%	0.0	WP 042037654.1
<i>A. rivuli</i>	62%	48%	61%	0.0	WP 042043199.1
<i>A. salmonicida</i> A449	70%	48%	62%	0.0	ABO 90268.1
<i>A. sanarellii</i>	63%	49%	63%	0.0	WP 042077492.1
<i>A. taiwanensis</i>	65%	49%	62%	0.0	WP 043807984.1

A análise baseada no banco de dados de domínios conservados (CDD), possibilitou identificar em Nuc 5 domínios disposto na orientação N-terminal para C-terminal descritos como: (i) LTD (*Lamin Tail Domain*), encontrado em várias proteínas bacterianas associado com hidrolases de membrana como metalo-beta-lactamases, synaptojanin e calcineurin-like pertencentes à superfamília fosfoesterase, (ii) YhcR-OBF-like, conforme descrito anteriormente, (iii) EEP (Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase) conforme descrito anteriormente, (iv e v) Calx-beta, correspondendo a domínios caracterizados pela troca de Na-Ca e integrina subunidade beta 4. Dentre estes domínios, dois deles, correspondendo aos domínios YhcR-OBF-like e EEP são idênticos a aqueles observados para a enzima Aha3441, indicando uma íntima relação entre as duas proteínas. Uma representação comparativa entre os domínios conservados observados na enzima Aha3441 e aqueles observados na enzima Nuc é apresentada na Figura 53.

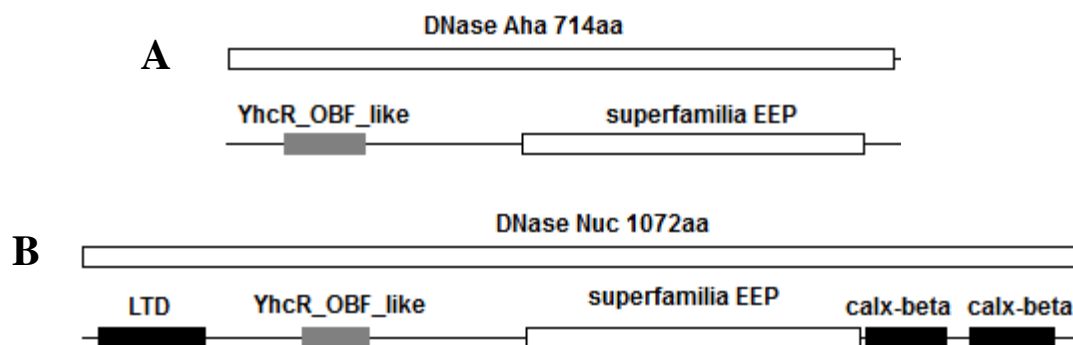


Figura 53. Representação esquemática dos domínios conservados das DNases Aha3441 (A) e Nuc (B), mostrando os domínios comuns a ambas as enzimas.

Com o intuito de comparar a sequência de aminoácidos da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 com sequências de aminoácidos correspondente a proteínas homologas de outras espécies bacterianas, uma nova análise de BLASTp foi realizada sendo consideradas apenas proteínas com identidades iguais ou superiores a 45% e com coberturas superiores a 90%.

Os resultados obtidos mostram que a enzima Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta homologia com DNases de diversas espécies dos gêneros *Photobacterium*, *Shewanella*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Vibrio* e *Aliivibrio* (ANEXO IV).

Considerando o gênero *Aliivibrio*, a comparação da DNase Aha3441 de IBAer119 em relação aos seus homólogos permitiu identificar identidades de 45% e positivities de 61%. Para o gênero *Enterovibrio*, a análise permitiu identificar identidades 48% e positividade variando entre 71 e 73%. Por sua vez identidades entre 45 e 52% e positivities entre 64 e 68% foram observadas entre a DNase Aha3441 de IBAer119 e seus homólogos correspondentes em bactérias do gênero *Photobacterium*. Já para o gênero *Shewanella*, as DNases com homologia a Dns de IBAer119 apresentaram identidades variando de 48 a 53% e positivities variando entre 61 e

67%. A comparação entre a DNase Aha3441 de IBAer119 com seus homólogos correspondentes entre bactérias do gênero *Vibrio*, permitiu identificar identidades entre 45 e 47% e positivities variando entre 60 e 62%. O único representante do gênero *Grimontia* apresentou uma identidade de 48% e uma positividade de 68%, sendo esta, a maior entre todas as bactérias avaliadas.

De um modo geral, considerando a média das identidades observadas entre os diferentes gêneros bacterianos analisados, a DNase Aha3441 apresenta maior similaridade com as DNases de bactérias do gênero *Photobacterium*, seguida por bactérias do gênero *Shewanella*, *Grimontia*, *Enterovibrio*, *Vibrio* e *Aliivibrio*. Este resultado indica que a DNase aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta uma maior relação com DNases dos gêneros *Photobacterium*, *Shewanella*, *Grimontia* e *Enterovibrio* em comparação aos outros dois gêneros (*Aliivibrio* e *Vibrio*).

Um fato curioso observado foi que os valores de identidade e positividade obtidos quando a DNase aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 foi comparada com espécies de outros gêneros bacterianos, mostraram-se bastante similares a aqueles observados quando Aha3441 foi comparada com a DNase Nuc presente em outras espécies de *Aeromonas*, indicando mais uma vez a possibilidade de ocorrência de uma evolução convergente entre as DNases avaliadas. Um alinhamento envolvendo um representante de cada gênero avaliado foi realizado e está representado no ANEXO V.

A análise de predição de peptídeo sinal permitiu identificar sequências líderes em todas os representantes avaliados com tamanhos variando entre 21 aa e 24 aa, indicando que esta classe de DNase é clivada durante o transporte do meio citoplasmático para o meio extracelular. Além disso, os resultados obtidos mostram a presença de 6 sítios, sendo 4 deles conservados, caracterizados pela presença de cisteínas em todas as espécies avaliadas, indicando, que estas cisteínas provavelmente

são fundamentais para a correta conformação da proteína. As 12 regiões correspondentes a superfícies genéricas de ligação identificadas no domínio YhcR-OBF-like, parecem desempenhar um importante papel na ligação a ácidos nucleicos. Em um estudo realizado por Chang *et al.* (2011), avaliando uma nuclease designada como nuclease A (SpnA) de *Streptococcus pyogenes* os autores identificaram dois possíveis domínios sendo estes caracterizados como: (i) possível oligossacarídeo/nucleotídeo *binding*, similar ao domínio YhcR-OBF-like, e (ii) um possível domínio Exo/Endonuclease/Phosphatase. Os resultados obtidos por Chang *et al.* (2011), sugerem que as regiões correspondentes ao domínio OBF de SpnA iniciam um importante papel na ligação a ácidos nucleicos, sendo que ao menos dois entre os três *motifs* OBF identificados, são necessários para a atividade de SpnA. Neste sentido podemos especular que na DNase Aha3441 as regiões correspondentes aos sítios de ligação genéricos observados dentro do domínio YhcR-OBF-like, podem apresentar a mesma importância que aquela observada para a nuclease SpnA de *Streptococcus pyogenes*.

Outro fato importante observado consiste na presença de dois sítios de ligação a metais, os quais são representados por um ácido glutâmico (E) e uma asparagina (N) sendo estes conservados em todas as espécies avaliadas, inclusive *A. hydrophila* IBAer119 (ANEXO V). O possível sítio catalítico foi identificado e apresenta 8 resíduos caracterizados pela presença dois resíduos de asparagina (N), um resíduo de ácido glutâmico (E), dois resíduos de histidina (H), e três resíduos de ácido aspártico (D). Por fim, três resíduos caracterizados como histidina (H), asparagina (N) e ácido aspártico (D), formam um possível sítio de ligação a fosfato (ANEXO V).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que em termos estruturais a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 é mais semelhante à nuclease

de *Photobacterium halotolerans*, considerando que ambas as bactérias não apresentam a região correspondente ao domínio LTD, e apresentam todos os demais domínios correspondentes, conforme mostrado no ANEXO V.

A modelagem tridimensional da DNase Aha3441 madura de *A. hydrophila* IBAer119 foi realizada empregando o *web server* Phyre² (Kelley & Sternberg, 2009). Dentre os 691 aminoácidos que constituem a DNase madura Aha3441, 68% dos resíduos foram modelados com um grau de confiança superior a 90% utilizando 11 *templates* baseados em *heuristics* para maximizar a confiança, o percentual de identidade e a cobertura do alinhamento. Apenas 193 resíduos o que corresponde a 28% de todos os aminoácidos analisados foram modelados empregando o método *ab initio*. Informações a respeito dos modelos cristalográficos empregados na modelagem de Aha3441 podem ser observados na Tabela 23.

Tabela 23. Relação dos modelos cristalográficos empregados na modelagem da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119.

<i>Template</i>	Cobertura do Alinhamento	Confiança	Identidade	Informações do <i>Template</i>
c3ngoA	280-665 (55%)	100%	16%	Ccr4-not: Hidrolase/subunidade 6-like do complexo de transcrição de DNA humano.
c4ruwA	293-666 (53%)	100%	23%	EEP: Hidrolase/ EEP de <i>Beutenbergia cavernae</i> dsm 12333
d2a40b1	294-662 (53%)	100%	17%	DNase I-like
c3mprB	292-664 (53%)	100%	22%	EEP: Hidrolase/ EEP de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
c3g6sA	292-664 (53%)	100%	21%	EEP: Hidrolase/ EEP de <i>Bacteroides vulgatus</i>
c3l1wE	294-664 (53%)	99,9%	19%	Proteína não caracterizada de <i>Enterococcus faecalis</i> v583

Continua.

<i>Template</i>	Cobertura do Alinhamento	Confiança	Identidade	Informações do Template
c4joiA	36-114 (11%)	95,6%	16%	Proteína de ligação ao DNA. Complexo cst subunidade stn1. Complexo telomérico humano stn1-ten1.
c4gopB	36-121 (12%)	95,4%	15%	Proteína de ligação ao DNA.
c3kf6A	36-121 (12%)	94,3%	13%	Proteína stn1: Complexo stn1-ten-1 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
c3dm3A	10-117 (15%)	94,2%	16%	Domínio correspondente a um fator de replicação a2 de <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
d1qzga	34-149 (16%)	56,8%	15%	OB-fold: proteína de ligação a ácidos nucleicos. Domínio de ligação ao DNA fita simples SSB, em <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .

EEP: Endonuclease/Exonuclease/Phosphatase.

A estrutura tridimensional da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 gerada empregando o *web server* Phyre² foi exibida com auxílio do programa Swis PdbViewer versão 4.1. (Figura 54)

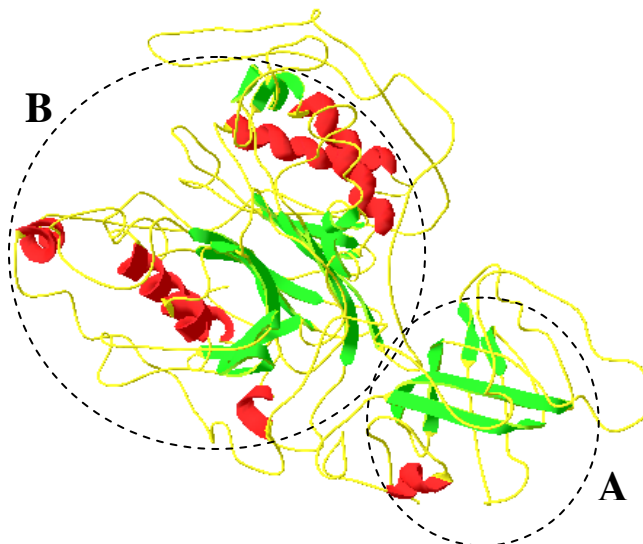


Figura 54. Modelo estrutural tridimensional da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119. (A) Domínio YhcR-OBF-like e (B) Domínio EEP (*Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase*).

Para avaliar a consistência estrutural da proteína Aha3441, o modelo gerado foi submetido a uma avaliação empregando gráfico de Ramachandran. De acordo com os resultados observados, embora a maior parte dos resíduos se encontre em regiões de conformação apropriada, cerca de 120 aa encontram-se fora destas regiões (Figura 55).

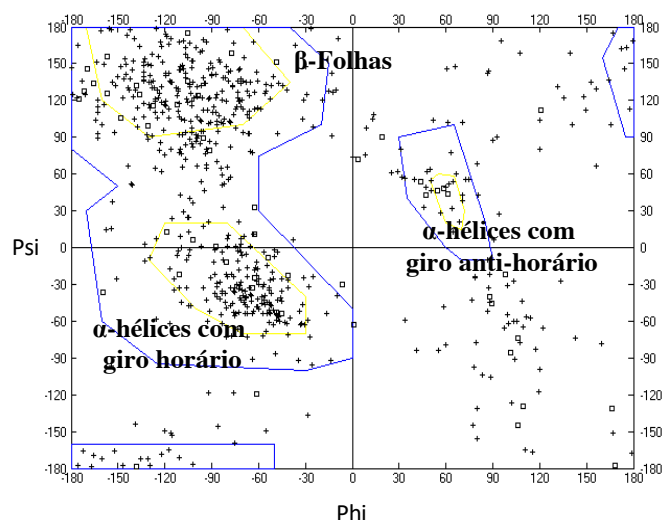


Figura 55. Gráfico de Ramachandran baseado no modelo tridimensional da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer 119.

Nos 68% da proteína Aha3441 modelada com um índice de confiança superior a 90%, encontram-se as regiões correspondentes aos dois domínios, definidos como YhcR-OBF-like e EEP (*Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase*). Diante deste fato, os dois domínios foram novamente modelados de forma separada para uma melhor visualização dos detalhes.

A nova modelagem empregando de forma isolada o domínio YhcR-OBF-like bem como a análise empregando o gráfico de Ramachandran foi realizada (Figura 56). O modelo empregando de forma isolada o domínio YhcR-OBF-like permitiu constatar que 78% dos resíduos foram modelados com um índice de confiança superior a 90% utilizando 6 *templates* baseados em *heuristics* para maximizar a confiança, o percentual de identidade e a cobertura do alinhamento. Além dos modelos c4gopB, c3dm3A e

c4joiA utilizados anteriormente, outros dois modelos correspondentes a c4owxB (proteína de ligação ao DNA pertencente ao complexo SOS subunidade b1) e c2k50A (Domínio correspondente a um fator de replicação de *Methanobacterium thermoautotrophicum*) foram utilizados na nova modelagem. Apenas 28 resíduos foram modelados empregando o método *ab initio*. A estrutura tridimensional obtida permitiu observar que as cisteínas localizadas nas posições Cys5 e Cys95, parecem ter uma importante participação na conformação deste domínio, considerando que estes sítios são conservados em outras espécies bacterianas conforme mostrado no ANEXO IV, posições 198 e 292 do alinhamento. Os resultados obtidos mediante avaliação do gráfico de Ramachandran permitiu observar também que a grande maioria dos resíduos encontra-se em regiões conformacionais apropriadas.

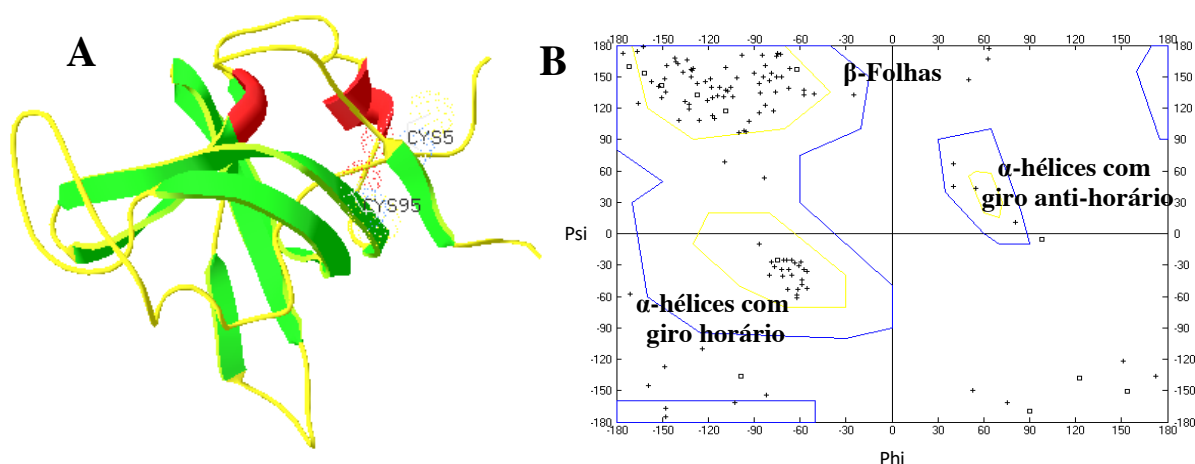


Figura 56. Modelagem tridimensional do domínio YhcR-OBF-like (A), e gráfico de Ramachandran correspondente a modelagem do domínio YhcR-OBF-like da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer 119 (B).

Assim como para o domínio YhcR-OBF-like, uma nova modelagem empregando exclusivamente o domínio EEP bem como a análise do gráfico de Ramachandran foi realizada (Figura 57). Considerando apenas o modelo tridimensional do domínio EEP correspondente a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 foi possível observar que dentre os quatro sítios correspondentes a cisteínas, dois deles

(Cys192 e Cys208), parecem apresentar uma maior importância na manutenção estrutural do domínio EEP, em relação aos sítios Cys26 e Cys38 (Figura 60). Os sítios correspondentes às posições Cys192 e Cys208 são extremamente conservados em outras espécies bacterianas conforme mostrado no ANEXO V, posições 711 e 731 do alinhamento. Novamente, os resultados obtidos mediante avaliação do gráfico de Ramachandran permitiu observar que a grande maioria dos resíduos encontra-se em regiões conformacionais apropriadas.

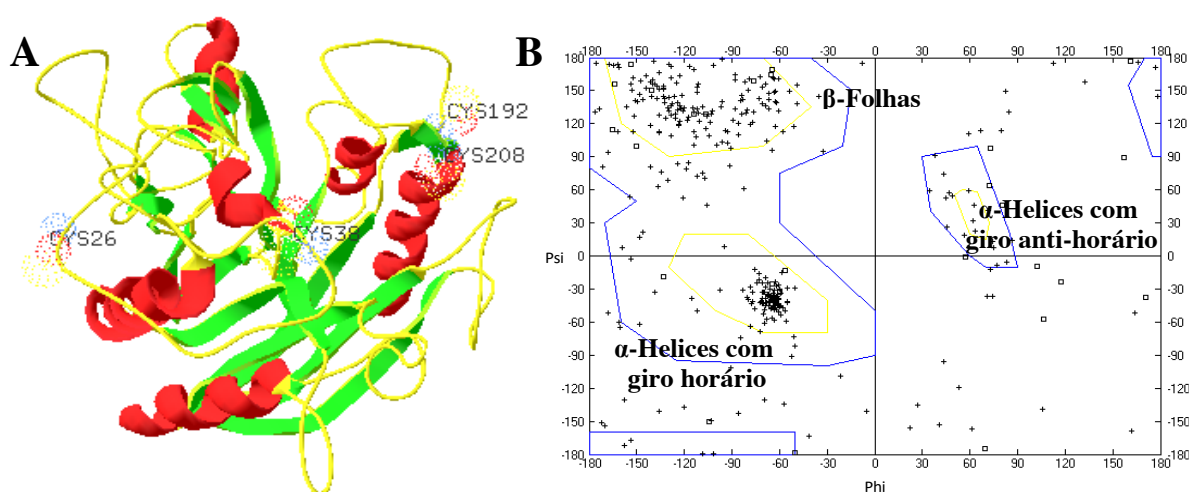


Figura 57. Modelagem tridimensional do domínio EEP (*Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase*) (A), e gráfico de Ramachandran correspondente a modelagem do domínio EEP (*Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase*) da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer 119 (B).

O modelo empregando de forma isolada o domínio EEP permitiu constatar que 92% dos resíduos foram modelados com um índice de confiança superior a 90% utilizando 6 *templates* baseados em *heuristics* para maximizar a confiança, o percentual de identidade e a cobertura do alinhamento.

Os modelos empregados na nova modelagem correspondem aos mesmo utilizados anteriormente (c3l1wE, c4ruwA, d2a40b1, c3mprB, c3g6sA e c3ngoA). Apenas 29 resíduos foram modelados empregando o método *ab initio*. Apesar dos seis modelos empregados como moldes na modelagem da DNase Aha3441 apresentarem

elevado grau de confiança, um fato chamou atenção. Ao analisar o trabalho realizado por Chang *et al.* (2011), o qual estudou uma DNase designada como SpnA de *Streptococcus pyogenes* foi possível observar que o modelo (1atn) utilizado pelo autor na modelagem de parte da enzima SpnA consiste na subunidade D da DNase I de pâncreas bovino (BP DNase I). Observando cautelosamente o modelo foi possível identificar que, do mesmo modo que para SpnA, o modelo gerado para DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta semelhanças estruturais com BP DNase I (Figura 59). O fato do modelo 1atn correspondente a BP DNase I, não ter sido empregado na modelagem de Aha3441 pode estar relacionado à baixa identidade encontrada entre as duas enzimas, considerando que o *web server* Phyre² leva em consideração este parâmetro. Apesar disso, a avaliação das regiões que constituem o sítio catalítico de ambas as estruturas apresentam um considerável nível de conservação (Figura 59).

Dentre os 9 resíduos que formam o sítio catalítico da BP DNase I (Asn7, Glu39, Glu78, His134, Asp168, Asn170, Asp212, Asp251 e His252), 8 resíduos (Asn7, Glu71, His184, Asp235, Asn237, Asp311, Asp360 e His361) coincidem com aqueles observados para o domínio EEP correspondente a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119. Assim como para BP DNase I, o domínio EEP correspondente a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119, apresenta uma conformação composta por dois conjuntos de folhas- β dobradas sobre si formando uma estrutura central tipo sanduíche. Além disso, os dois conjuntos centrais de folhas- β são flanqueados por algumas α -hélices, evidenciando mais uma vez a similaridade estrutural dos modelos (Figura 58).

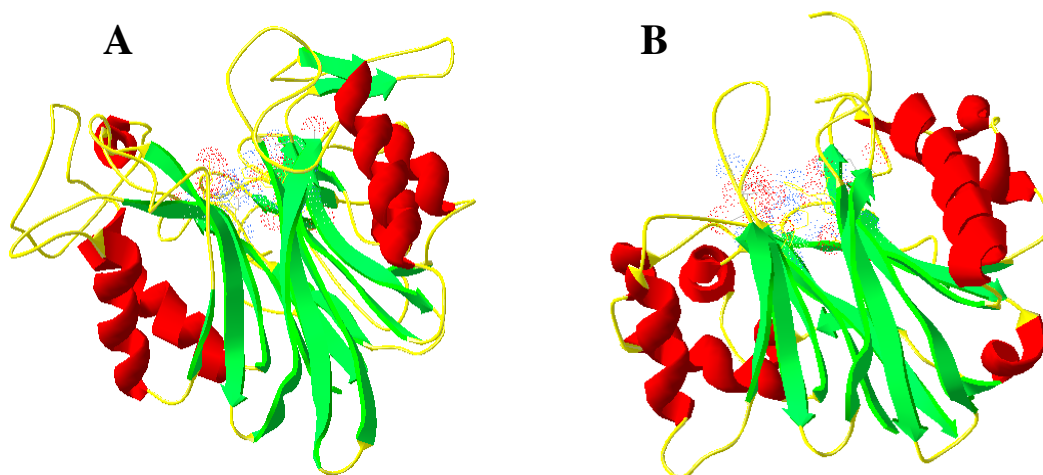


Figura 58. Modelo tridimensional do domínio EEP correspondente a DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 (A). Modelo tridimensional da cadeia D da DNase pancreática bovina BP DNase I (B). Região central representada por pontos coloridos correspondem aos sítios catalíticos.

A análise de predição de sítios de ligação a metais foi realizada empregando o *web server* 3DligandSite (Wass *et al.*, 2010) e subsequente exibida empregando o programa Swis PdbViewer versão 4.1. A avaliação possibilitou a identificação de um cluster formado por magnésio (Mg) e cálcio (Ca). As coordenadas de ligação foram identificadas no modelo, nas posições Glu71 e Asp306, correspondendo às posições Glu577 e Asp891 do alinhamento mostrado no ANEXO V. Além disso, uma análise utilizando informações contidas no NCBI, permitiu estabelecer quais os possíveis sítios de ligação a fosfato. Estes sítios compreendem os resíduos His184, Asn237 e Asp360, os quais correspondem às posições His703, Asn760 e Asp891 do alinhamento representado no ANEXO V. Detalhes referentes aos sítios de ligação a metais e aos sítios de ligação a fosfato podem ser visualizados na Figura 59.

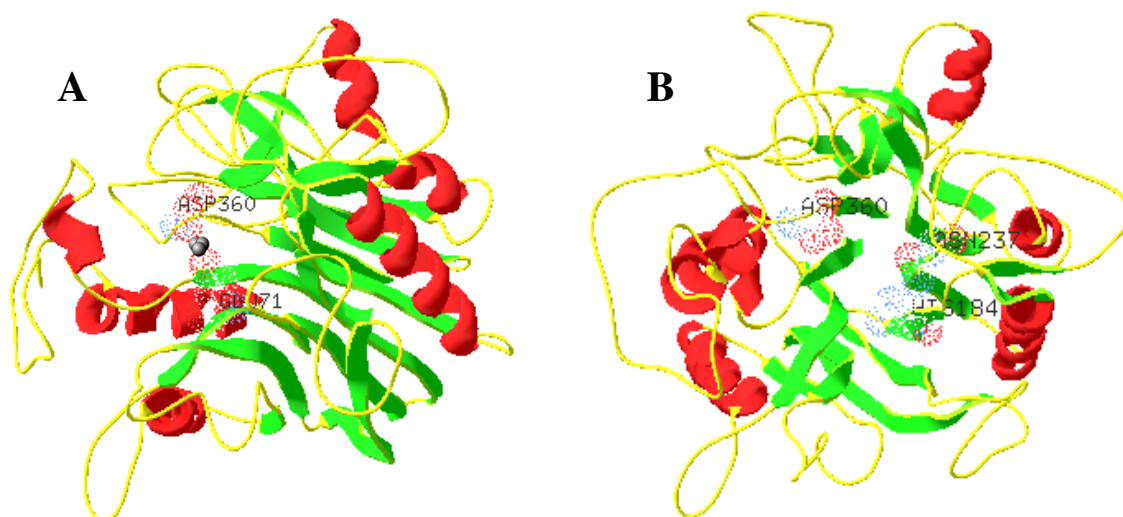


Figura 59. Representação dos sítios de ligação a metais (A) e sítios de ligação a fosfato (B), observados no domínio EEP da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119.

Estes resultados são condizentes com aqueles anteriormente discutidos no presente estudo os quais mostram que a Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 consiste em uma DNase magnésio dependente.

A análise de predição de sítios catalíticos presentes na DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 foi realizada empregando o *web server* EXIA2 (Lu *et al.*, 2014) e posteriormente exibida empregando o programa Swis PdbViewer versão 4.1. Esta avaliação permitiu identificar que o domínio EEP contido na DNase Aha3441 apresenta oito resíduos (Asn7, Glu71, His184, Asp235, Asn237, Asp311, Asp360 e His361), conforme mencionado anteriormente, com alta probabilidade de estarem envolvidos na formação do sítio catalítico desta enzima (Figura 60).



Figura 60. Representação do sítio catalítico da DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119.

Considerando que os resíduos que constituem o sítio catalítico são conservados entre as diferentes espécies bacterianas avaliadas (ANEXO V), e mesmo em relação à enzima BP DNase I, os resultados sugerem que estes resíduos podem desempenhar um papel similar nestas DNases, levando a crer que estas enzimas compartilham um mesmo mecanismo de ação.

5.8 Atividade das DNases extracelulares recombinantes Dns e Aha3441 sobre RNA e DNA plasmidial linearizado

Para determinar a especificidade por substratos aproximadamente 1 µg de RNA de *Torula* (USB[®]), ou do plasmídeo pCAMBIA1303 linearizado foi incubado com 5 µL do extrato bruto extracelular contendo as enzimas recombinantes Dns ou Aha3441. As reações foram realizadas em um volume de 20µL em tampão 20mM de Tris-HCl (pH 8,0), 5mM de MgCl₂, 2mM de CaCl₂, e incubadas a 37°C por 1h. Como controles positivos da reação o extrato bruto extracelular contendo as enzimas clonadas Dns ou Aha3441 foi substituído por 1 µL de RNase A (20 mg/mL) ou DNase I (2U/µL) incubadas sob as mesmas condições. Após o período de incubação a reação foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 61).

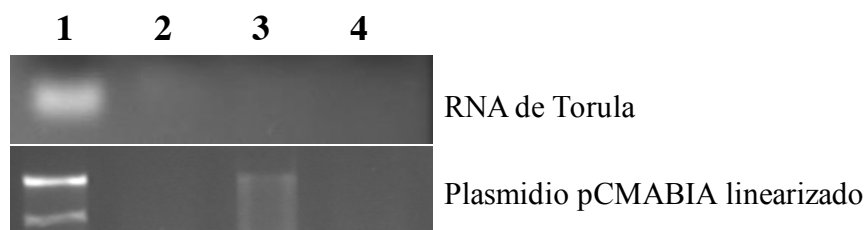


Figura 61. Digestão de RNA e DNA plasmidial por Dns e Aha3441. 1- RNA e DNA plasmidial não tratado enzimaticamente, 2- RNA e DNA plasmidial tratado com a enzima Dns, 3- RNA e DNA plasmidial tratado com a enzima Aha3441, 4- Controle positivo, RNA e DNA plasmidial tratado com RNase A (RNA) ou DNase I (DNA plasmidial).

Os resultados obtidos mostram que ambas as enzimas (Dns e Aha3441) apresentam capacidade de degradar ambos os substratos testados, indicando que estas enzimas correspondem a nucleases açúcar não específica. Estes resultados confirmam aqueles observados por Nam *et al.* (2004) para a enzima MBP-Nuc de *A. hydrophila* homologa a Dns avaliada neste estudo. Estas mesmas características foram reportadas para as enzimas Vvn de *V. vulnificus* e NucM de *E. chrysanthemi* (Moulard *et al.*, 1993; Wu *et al.* 2001). O conjunto de resultados observados para a enzima Aha3441, indica tratar-se de uma nova nuclease açúcar não específica caracterizada pela primeira vez neste trabalho. Conforme apontam os resultados obtidos, tanto Dns quanto Aha3441, parecem não estar envolvidas no metabolismo intracelular de ácidos nucléicos tais como recombinação e reparo, sugerindo que estas nucleases estão mais relacionadas à proteção quanto à entrada de DNA exógeno, captação de nucleotídeos ou fosfatos provenientes do ambiente extracelular, ou mesmo a eventos de virulência associados a outros fatores de patogenicidade.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível tecer as seguintes conclusões:

- 1- Bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam ampla variação intra e interespecífica na atividade DNásica extracelular. *Aeromonas hydrophila* apresenta maior atividade do que outras espécies do gênero, mas não foi constatada diferença significativa entre isolados clínicos e ambientais desta espécie.
- 2- A avaliação dos perfis de DNases extracelulares, por zimogramas, permitiu a identificação de seis bandas de degradação de DNA correspondendo a proteínas com massas moleculares aparentes entre 22 e 119 KDa. A análise de agrupamento UPGMA não permitiu a formação de grupos espécie-específicas ou de relação entre isolados clínicos e ambientais.
- 3- As DNases com massas moleculares aparente de 22 e 85 KDa caracterizadas como Dns e Aha, respectivamente, foram as mais frequentes entre todos os isolados de *Aeromonas* spp. avaliados, indicando uma elevada importância destas enzimas para o gênero. Por outro lado, a DNase com massa molecular aparente de 32 KDa foi a que apresentou menor frequência sendo o gene responsável por sua codificação ainda não determinado.
- 4- De um modo geral, as DNases de 22, 32 e 85 KDa apresentaram uma maior estabilidade térmica em relação às demais DNases avaliadas.
- 5- As DNases produzidas e secretadas por *A. hydrophila* IBAer119 são afetadas pela ação de proteases extracelulares, as quais promovem uma redução na atividade DNásica extracelular.

- 6- Dentre as quatro DNases observadas no isolado de *A. hydrophila* IBAer119, apenas a DNase de 103 KDa sugere apresentar uma tendência comportamental característica de regulação por “*quorum sensing*”.
- 7- A avaliação da expressão dos genes *dns*, *aha* e *nuc* de *A. hydrophila* IBAer119 permitiu observar elevadas taxa transcricionais para os genes *dns* e *aha*, sendo estas detectadas com 12h de crescimento, coincidindo com o pico de atividade DNásica extracelular.
- 8- As DNases parecem não desempenham, de modo preferencial, um papel nutricional em *A. hydrophila* IBAer119 sugerindo que sua função está mais relacionada à proteção quanto à entrada de DNA exógeno ou a eventos relacionados à patogenicidade.
- 9- O gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119 foi clonado e expresso com sucesso em *E. coli* DH5 α . A proteína recombinante foi secretada para o ambiente extracelular.
- 10- A DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 utiliza preferencialmente magnésio como cofator, sendo caracterizada como uma metalo-DNase. Foi possível observar ainda que a DNase Dns é fortemente inibida por EDTA e por SDS.
- 11- Os melhores pHs e temperaturas de ação da DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 variaram entre 7 e 9 e entre 37°C e 60°C, respectivamente.
- 12- A DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 mostrou elevada estabilidade térmica quando mantida a 40°C por até 50 minutos. No entanto, uma redução na estabilidade térmica é observada quando a enzima é mantida por longos períodos de tempo em temperaturas de 60°C ou 90°C.

- 13- A análise da sequência deduzida de aminoácidos de Dns permitiu identificar um peptídeo sinal de 20aa, possibilitando sua secreção para o ambiente extracelular através de sistema secII.
- 14- A DNase Dns de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta um domínio característico correspondente à superfamília da endonuclease I. A comparação com outras DNases permitiu observar que Dns apresenta elevado grau de homologia com DNases de bactérias dos gêneros *Aliivibrio*, *Dickeya*, *Shewanella*, *Serratia*, *Vibrio* e *Erwinia*, além de DNases de *E. coli* e *Oceanimonas smirnovii*.
- 15- O modelo tridimensional proposto da DNase Dns apresenta uma estrutura em formato de “V” com quatro pontes dissulfeto, conservadas tanto em *Aeromonas* quanto em outras bactérias, indicando que estas ligações desempenham um importante papel na conformação desta enzima.
- 16- Além disso, o modelo tridimensional da DNase Dns apresenta sítios de ligação a cálcio e a magnésio, e um sítio catalítico com topologia $\beta\beta\alpha$ -metal, típicos de endonuclease identificadas em outros organismos.
- 17- O gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119 foi clonado e expresso com sucesso em *E. coli* DH5 α . A proteína codificada pelo gene foi secretada para o ambiente extracelular.
- 18- Do mesmo modo que para Dns, Aha3441 utiliza preferencialmente magnésio como cofator, sendo caracterizada como uma metalo-DNase. Foi possível observar ainda que a DNase Aha3441 é inibida por EDTA e por SDS.
- 19- A DNase Aha3441 apresenta alta atividade em pHs variando entre 7 e 9, e temperaturas de 37°C a 50°C.
- 20- A DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 mostrou elevada estabilidade térmica quando mantida a 40°C por até 50 minutos. No entanto, uma redução

estabilidade térmica é observada quando a enzima é mantida por longos períodos de tempo em temperaturas de 60°C ou 90°C.

- 21- A análise da sequência deduzida de aminoácidos de Aha3441 permitiu identificar um peptídeo sinal (secII) de 23aa, o qual é responsável por sua secreção para o ambiente extracelular.
- 22- A DNase Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 apresenta domínios característicos correspondentes aos da superfamília EEP e da subfamília OB folds. Estes domínios são similares a aqueles observados em outra nuclease de *Aeromonas* denominada Nuc, indicando uma íntima relação entre estas enzimas.
- 23- A comparação com outras DNases permitiu observar que Aha3441 apresenta elevado grau de homologia com DNases de bactérias dos gêneros *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Enterovibrio*, *Vibrio* e *Grimontia*.
- 24- O modelo tridimensional de Aha3441 permitiu observar elevada similaridade conformacional com a cadeia D da DNase pancreática bovina BP DNase I. Os sítios de ligação a metais, sítios de ligação a fosfato e sítio catalítico são bastante conservados dentro do gênero *Aeromonas*, entre as demais bactérias avaliadas e mesmo a cadeia D da DNase pancreática bovina (BP DNase I), indicando que estas enzimas compartilham o mesmo mecanismo de ação.
- 25- Tanto Dns quanto Aha3441 apresentaram capacidade de degradar RNA e DNA plasmidial linearizado, sendo assim caracterizadas como nucleases açúcares não específicas. Embora estudos ainda se façam necessários, ambas as enzimas apresentam um potencial para utilização em processos biotecnológicos.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras deste trabalho se encontram:

- 1- A identificação e clonagem do gene que codifica a DNase de 32 KDa.
- 2- Clonagem, purificação e estudos de cinética enzimática das DNases de 32 KDa, Dns e Aha3441.
- 3- O desenvolvimento de linhagens de *Aeromonas* spp. rompidas para as quatro DNases identificadas no isolado de *A. hydrophila* IBAer119 com o objetivo de estabelecer seu papel fisiológico ou como fator de patogenicidade em modelos animais.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbott, S.L.; Cheung, W.K.W.; Janda, J.M. (2003). The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. **J. Clin. Microbiol.** 41: 2348-2357.
- Accetto, T. & Avgustin, G. (2007). Studies on *Prevotella* nuclease using a system for the controlled expression of cloned genes in *P. bryantii*. **Microbiol.** 153: 2281-2288.
- Adamski, J.; Koivuranta, M.; Leppänen, E. (2006). Fatal case of myonecrosis and septicemia caused by *Aeromonas hydrophila* in Finland. **Scand. J. Infect. Dis.** 38: 48-51.
- Al-Benwan, k.; Abbott, S.; Janda, J.M.; Albert, M.J. (2007). Cystitis caused by *Aeromonas caviae*. **J. Clin. Microbiol.** 45: 2348-2350.
- Albert, M.J.; Ansaruzzaman, M.; Talukder, K.A.; Chopra, A.K.; Kuhn, I.; Rahman, M.; Faruque, A.S.G.; Islam, M.S.; Sack, R.B.; Mollby, R. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **J. Clin. Microbiol.** 38: 3785-3790.
- Altermark, B.; Smalas, A.O.; Willassen, N.P.; Helland., R. (2006a). The structure of *Vibrio cholerae* extracellular endonuclease I reveals the presence of a buried chloride ion. **Acta Crystallogr.** 62: 1387-1391.
- Altermark, B.; Niiranen, L.; Willassen, N.P.; Smalas, A.O.; Moe, E. (2006b). Comparative studies of endonuclease I from cold-adapted *Vibrio salmonicida* and mesophilic *Vibrio cholerae*. **FEBS J.** 274: 252-263.
- Altwegg, M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. (1999). In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (Ed.). **Manual of Clinical**

Microbiology 7th, American Society for Microbiology. 507–516.

Anfinsen, C.B.; Cuatrecasas, P.; Taniuchi, H. (1971). Staphylococcal nuclease, chemical properties and catalysis. In: **The enzymes. (Boyer, P. ed). Vol. 4. Academic Press.** N.Y.

Angel, M.F.; Zhang, F.; Jones, M.; Henderson, J.; Chapman, S.W. (2002). Necrotizing fasciitis of the upper extremity resulting from water moccasin bite. **South Med. J.** 95: 1090-1094.

Arnadottir, H.; Hvanndal, L.; Andersdottir, V.; Burr, S.E.; Frey, J.; Gudmundsdottir, B.K. (2009). The AsaPI peptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp *achromogenes* is highly conserved deuterolysin metaloprotease (family M35) and a major virulence factor. **J. Bacteriol.** 109: 403-410.

Asao, T.; Kinoshita, Y.; Kozaki, S.; Uemura, T.; Sakaguchi, G. (1984). Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. **Infect. Immun.** 46: 122-127.

Bairoch, A.; Apweiler, R.; Wu, C.H.; Barker, W.C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; Gasteiger, E.; Huang, H.; Lopez, R.; Magrane, M.; Martin, M.J.; Natale, D.A.; O'Donovan, C.; Redaschi, N.; Yeh, L.S. (2005). The universal protein resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.** 33: 154-159.

Ball, T.K.; Saurugger, P.N.; Benedik, M.J. (1987). The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. **Gene.** 57: 183-192.

Ball, T.K.; Wasmuth, C.R.; Braunagel S.C.; Benedik, M.J. (1990). Expression of *Serratia marcescens* extracellular proteins requires *recA*. **J Bacteriol.** 172: 342-349.

Ball, T.K.; Suh, Y.; Benedik, M. (1992). Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. **Nucleic Acids Res.** 20: 4971-4974.

- Barnett, T.C.; Kirov, S.M.; Strom, M.S.; Sanderson, K. (1997). *Aeromonas* spp. Possess at least two distinct type IV pilus families. **Microb. Pathog.** 23: 241-247.
- Beenken, K.E.; Spencer, H.; Griffin, L.M.; Smeltzer, M.S. (2010). Impact of extracellular nuclease production on biofilm phenotype of *Staphylococcus aureus* under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Infect. Immun.** 80: 1634-1638.
- Benedik, M.J. & Strich, U. (1998). *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. **FEMS Microbiol. Lett.** 165: 1-13.
- Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Sayers, E.W. (2009). GenBank. **Nucleic Acids Res.** 37: 26-31.
- Berends, E.T.M.; Horswill, A.R.; Haste, N.M.; Monestier, M.; Nizet, V.; von Köckritz-Blickwede. (2010). Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **J. Innate Immun.** 2: 576-586.
- Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. (2000). The protein data bank. **Nucleic Acids Res.** 28: 235-242.
- Bernard, E.A. (1969). Ribonucleases. **Annu. Rev. Biochem.** 38: 677-682.
- Bernardes, M.V.S.; Mesquita, A.J.; Nunes, I.A.; Silva, P.C.; Rios, E.R.; Marques, L.R.S. (2003). Avaliação de Três Diferentes Sanitizantes em Viveiros de Piscicultura pela Contagem de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Ciê. Animal Bras.** 4: 69-83.
- Bhuyan, A.K. (2010). On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. **Biopolymers.** 93: 186-199.
- Bizani, D. & Brandelli, A. (2001). Perfil de resistência/sensibilidade e virulência de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água obtidas em abatedouro de bovinos. **Braz. J. Microbiol.** 32:334-339.

- Blokesch, M. & Schoolnik, G.K. (2008). The extracellular nuclease Dns and its role in natural transformation of *Vibrio cholerae*. **Jour. Bacteriol.** 190: 7232-7240.
- Bonato, M.C.M.; Costa, S.O.P.; Bianco, M. (1982). Instability of the protease (gelatinase) train in *Proteus mirabilis*. I study of newly isolated strains. **Rev. Microbiol.** 13:35-45.
- Borrel, N.; Acinas, S.G.; Figueiras, M.; Martinez-Murcia, A.J. (1997). Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1671-1674.
- Bossi-küpfer, M.; Genini, A.; Peduzzi, R.; Demarta, A. (2007). Tracheobronchitis caused by *Aeromonas veronii* biovar sobria after near-drowning. **J. Med. Microbiol.** 56: 1563-1564.
- Brakstad, O.G.; Aasbakk, K.; Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification on the *nuc* gene. **Jour. Clin. Microbiol.** 30: 1654-1660.
- Buchanan, R.L. & Palumbo, S.A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Safety.** 7: 15-29.
- Bulhões, C.C.C. & Rossi Junior, O.D. (2002). Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 54: 320-324.
- Burke, V.; Robinson, J.; Gracey, M.; Peterson, D.; Partridge, K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** 48: 361-366.
- Carnahan, A.M. & Altwegg, M. (1996). Taxonomy. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed) **The Genus *Aeromonas***. John Wiley & Sons, New York, NY. P 1 – 38.

- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interaction: redefining the basic concept of virulence and pathogenicity. **Infect. Immun.** 67: 3703-3713.
- Cascón, A.; Jugueros, J.; Temprano, A.; Sánchez, M.; Hemanz, C.; Lunego, M. J.; Naharro, G. A. (2000). A Major Secreted Elastase is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophilla*. **Infect. Immun.** 68: 3233-2341.
- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M.J.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Hernández-Rendón, E.; Aparicio, G.O.; Guarro, J. Chacón, M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. Isolated from Frozen Fish Intended for Human Consumption in México. **Int. J. Food Microbiol.** 84: 41-49.
- Ceylan, E.; Berktaş, M.; Agaoglu, Z. (2009). The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock. **Trop. Anim. Health Prod.** 41: 221-225.
- Chacón, M.R.; Figueras, M.J.; Castro-Escarpulli, G.; Soler, L.; Guarro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.** 84: 269-278.
- Chang, A.; Khemlani, A.; Kang, H.; Proft, T. (2011). Functional analysis of *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor. **Mol. Microbiol.** 76: 1629-1642.
- Chang, M.C.; Chang, S.Y.; Chuang, S.M. (1992). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular deoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. **Gene.** 122: 175-180.
- Chai, B.; Wang, H.; Chen, X. (2012). Draft genome sequence of high-melanin-yielding *Aeromonas media* SW. **J. Bacteriol.** 194: 6693-6694.
- Chen, L.Y.; Ho, H.C.; Tsai, Y.C.; Liao, T.H. (1993). Deoxyribonuclease of *Syncephalastrum racemosum* – enzymatic properties and molecular structure. **Arch. Biochem. Biophys.** 303: 51-56.

- Cheng, Y.S.; Hsia, K.C.; Doudeva, L.G.; Chak, K.F.; Yuan, H.S. (2002). The crystal structure of the nuclease domain of ColE7 suggests a mechanism for binding to double-strand DNA by H-N-H endonuclease. **J. Mol. Biol.** 324: 227-236.
- Chopra, A.K. & Houston, C.W. (1999). Enterotoxin in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes. Infect.** 1: 1129-1137.
- Chow, T.Y.K. & Resnick, M.A. (1987). Purification and characterization of an endonuclease from *Saccharomyces cerevisiae* that is influenced by the *RAD52* gene. **J. Biol. Chem.** 262: 17659-17667.
- Chu, W.; Lui, Y.; Jiang, Y. (2013). Production of *N*-acyl homoserine lactone and virulence factors of waterborne *Aeromonas hydrophila*. **Indian J. Microbiol.** 53: 264-268.
- Chuang, Y.C.; Chiou, S.F.; Su, J.H.; Wu, M.L.; Chang, M.C. (1997). Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology.** 143: 803-812.
- Clark, N. & Chenoweth, C.E. (2003). *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. **Clin. Infect. Dis.** 37: 506-513.
- Colwell, R.R. & Macdonell, M.T. (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36: 473-477.
- Costa, F.N. & Rossi Júnior, O.D. (2002) Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 54: 534-535.
- Davis, A.; Moore, I.B.; Parker, D.S.; Taniuchi, H. (1977). Nuclease B. A possible precursor of nuclease A, an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. **J. Biol. Chem.** 252: 6544-6551.
- De Gascun, C.F.; Rajan, L.; O'Neill, E.; Downey, P.; Smyth, E. G. (2007). Pancreatic abscess due to *Aeromonas hydrophila*. **J. Infect.** 54: e59-e60.

- Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Silveira, M.M.; Echeverrigaray, S. (2000). Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 57-60.
- Desai, N.A. & Sharkar, V. (2003). Single-strand-specific nucleases. **FEMS Microbiol. Rev.** 26: 457-491.
- Desai, N.A. & Sharkar, V. (2007). Single-strand-specific nuclease from *Basidiobolus haptosporus* (Nuclease Bh1). **Sci. Res. Essays.** 2 (5): 139-146.
- Dodd, H.N., Peberton, J.M. (1996). Cloning, sequencing, and characterization of the *nucH* gene encoding an extracellular nuclease from *Aeromonas hydrophila* JMP626. **J. Bacteriol.** 178: 3926-3933.
- Dodd, H.N. & Pemberton, J.N. (1999). The gene encoding a periplasmatic deoxyribonuclease from *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiol. Lett.** 173: 42-46.
- Dooley, J.S.G.; Lallier, R.; Shaw, D.H.; Trust, T.J. (1985). Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. **J. Bacteriol.** 164: 263-269.
- Dugenci, S.K. & Candan, A. (2003). Isolation of *Aeromonas* Strains from the Intestinal Flora of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L. 1758). **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 27: 1071-1075.
- Eaves, G.N. & Jeffries, C.D. (1963). Isolation and properties of an extracellular nuclease of *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.** 85: 273-278.
- Ellison, E.L. (1993). Interaction of the intron-encoded mobility endonuclease I-*PpoI* with target site. **Mol. Cell. Biol.** 13: 7531-7539.
- Erickson, A; Deibel, R.H. 1973. Turbidimetric assay of Staphylococcal nuclease. **Appl. Microbiol.** 25:337-341.

- Erova, T.E.; Pillai, L.; Fadl, A.A.; Sha, J.; Wang, S.; Galindo, C.L.; Chopra, A.K. (2006), DNA adenine methyltransferase influences the virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 74: 410-424.
- Esteve C. & Birkbeck T.H. (2004). Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (Elastase). **J. Appl. Microbiol.** 96: 994-1001.
- Fang, J.S.; Chen, J.B.; Chen, W.J.; Hsu, k.T. (1999). Hemolytic-uraemin syndrome in an adult male with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. **Nephrol. Dial. Transplant.** 14: 439-440.
- Ferguson, M.R.; Xu, X.J.; Houston, C.W. (1997). Hyper-production, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 65: 4299-4308.
- Figueras, M. J.; Guaro, J.; Martínez-Murcia, A. (2000). Clinically relevant *Aeromonas* species. **Clin. Infect. Dis.** 30: 988-989.
- Figueras, M. J. (2005). Clinical relevance of *Aeromonas* sM503. **Rev. Microbiol.** 16: 145-153.
- Finkel, S.E. & Kolter, R. (2001). DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. **J. Bacteriol.** 183: 6288-6293.
- Flick, K.E.; Jurica, M.S.; Monnat, R.J.; Stoddart, B.L. (1998). DNA binding and cleavage by the intron-encoded homing endonuclease I-PpoI. **Nature.** 394: 96-110.
- Focareta, T. & Manning, P.A. (1987). Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: molecular cloning, nucleotide sequence and characterization of the desoxyribonuclease (Dnase) together with its periplasmic localization in

- Escherichia coli* K-12. **Gene** 53: 31-40.
- Focareta, T. & Manning, P.A. (1991). Distinguishing between extracellular DNase of *Vibrio cholera* and development of a transformation system. **Mol. Microbiol.** 5: 2547-2555.
- Foster, P.L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** 42: 373-397.
- Fox, K.R. & Waring, M.J. (1987) The use of micrococcal nuclease as a probe for drug-binding sites on DNA. **Biochem. Biophys. Acta.** 909: 145-155.
- Friedhoff, P.; Gimadutdinow, O.; Pingoud, A. (1994). Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis. **Nucleic Acids Res.** 22: 3280-3287.
- Friedhoff, P.; Meiss, G.; Kolmes, B.; Pieper, U.; Gimadutdinow, O.; Urbanke, C.; Pingoud, A. (1996). Kinetic analysis of the cleavage of natural and synthetic substrates by the *Serratia* nuclease. **Eur. J. Biochem.** 241: 572-580.
- Friedhoff, P.; Franke, I.; Meiss, G.; Wende, W.; Krause, K.L.; Pingoud, A. (1999). A similar active site for non-specific and specific endonucleases. **Nat. Struct. Biol.** 6: 112-113.
- Gaasbeek, E.J.; Wagenaar, J.A.; Guilhabert, M.R.; Wösten, M.M.S.M.; van Putten, J.P.M.; Van der Graaf-van Bloois, L.; Parker, C.T.; van der Wal, F. (2009). A DNase encoded by integrated element CJIE1 inhibits natural transformation of *Campylobacter jejuni*. **J. Bacteriol.** 191: 2296-2306.
- Galindo, C.L.; Gutierrez Jr., C.; Chopra, A.k. (2006). Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. **Microb. Pathogenesis.** 40: 56-68.
- Gao, X.; Jian, J.; Li, W.J.; Yang, Y.C.; Shen, X.W.; Sun, Z.R.; Wu, Q.; Chen, G.Q.

- (2013). Genomic study of polyhydroxyalkanoates producing *Aeromonas hydrophila* 4AK4. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97: 9099-9109.
- Garrit, G.M.; Winters M.; Searles D.B. (2001). Taxonomic outline of the prokaryotic genera Bergey's manual of systematic bacteriology [document on line]. **Bergey's manual trust**. 2nd ed. Version 4.01. New York: Spriners-Verlag;
- Ghenghesh, K.S.; Abeid, S.S.; Jaber, M.M.; Ben-Taher, S.A. (1999). Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. **Comp. Immunol. Microb.** 22: 175-179.
- Gibson, J.R. & McFee, R.A. (1993). PCR products generated from unpurified *Salmonella* DNA are degraded by thermostable nuclease activity. **Let. Appl. Microbiol.** 16: 59-61.
- Gosling, P. (1996). Pathogenic Mechanisms. In: B. Austin, M. Altwegg, P. Gosling & S.W. Joseph (Eds.). The Genus *Aeromonas*. **John Wiley & Sons**, New York, NY: 39-76.
- Gray, H.B.; Ostrander, D.A.; Hodnett, J.L.; Legerski, R.J.; Robberson, D.L. (1975). Extracellular nucleases of *Pseudomonas* BAL 31. I. Characterization of single-strand-specific deoxyribonuclease and double-strand deoxyribonucleas activities. **Nucleic Acids Res.** 2: 1459-1492.
- Gray, H.B.; Winston, T.P.; Hodnett, J.L.; Legerski, R.J.; Ness, D.W.; Wei, C.F.; Robberson, D.L. (1981). The extracellular nuclease from *Alteromonas espejiana*: an enzyme highly specific for nonduplex structure in nominally duplex DNAs. In: **Gene Amplification and Analysis**, Vol. 2. (Chirikijian, J.G. and Papas, T.S., Eds.). Elsevier, North Holland/New York. p. 169-203.
- Greger, B. & Kemper, B. (1998). An apyrimidinic site kinks DNA and triggers incision by endonuclease VII of phage T4. **Nucleic Acids Res.** 26: 4432-4438.

- Hale, S.P.; Poole, I.B.; Gerlt, J.A. (1993). Mechanism of the reaction catalyzed by staphylococcal nuclease: identification of the rate-determining step. **Biochem.** 32: 7479-7487.
- Hande, H.S.; Shobha, K.L.; Thunga, R.K.; Anand, K.M. (2006). Detection of Aeromonadas in water samples in and around manipal: a preliminary study. **Ind. Jour. Pract. Doctor.** 3:4.
- Handfield, M.; Simard, P.; Couillard, M.; Letarte, R. (1996). *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). **Appl. Environ. Microb.** 62: 3459-3462.
- Hänninen, M.L. & Sitonen, A. (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. **Epidemiol. Infect.** 115: 39-50.
- Hass, B.; Bonifait, L.; Vaillancourt, K.; Charette, S.J.; Gottschalk, M.; Grenier, D. (2014). Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. **BMC Res. Notes.** 7: 424-431.
- Heun, M.; Binnenkade, L.; Kreienbaum, M.; Thormann, K.M. (2012). Functional specificity of extracellular nucleases of *Shewanella oneidensis* MR-1. **Appl. Environ. Microb.** 78: 4400-4411.
- Hickman-Brenner, F.W.; Fanning, G.R.; Arduino, M.J.; Brenner, D.J.; Farmer, J.J. (1998). *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.** 26: 1561-1564.
- Hiransuthikul, N.; Tantisiriwat, W.; Lertutsahakul, K.; Vibhagool, A.; Boonma, P. (2005). Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. **Clin. Infect. Dis.** 41: e93-e96.

- Ho, H.C.; Shiau, P.F.; Liu, F.C; Chung, J.G.; Chen, L.Y. (1998). Purification, characterization and complete amino acid sequence of nuclease C from *Cunninghamella echinulata* var. *echinulata*. **Eur. J. Biochem.** 256: 112-118.
- Holm, L. & Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucl. Acids Res.** 38: 545-549.
- Holmes, P.; Niccolls L.M.; Sartory D.P. (1996). The ecology of mesophylic *Aeromonas* in the aquatic environment. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. **The genus *Aeromonas***. New York: John Wiley & Sons. p. 127-150.
- Howard, S. P. & Buckley, J. T. (1985). Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. **J. Bacteriol.** 163: 336-340.
- Howard, S. P., Buckley, J. T. (1986). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. **Mol. Gen. Genet.** 204: 289-295.
- Hsueh, P.R.; Teng, L.J.; Lee, L.N.; Yang, P.C.; Chen, Y.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T. (1998). Indwelling device-related and recurrent infections due to *Aeromonas* species. **Clin. Infect. Dis.** 26: 651-658.
- Hsia, K.C.; Li, C.L.; Yuan, H.S. (2005). Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense. **Curr. Op. Struct. Biol.** 15: 126-134.
- Hu, Y.; Xie, Y.; Tang, J.; Shi, X. (2012). Comparative expression analysis of two thermostable nuclease genes in *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathog Dis.** 9: 265-271.
- Hua, H.T.; Bollet, C.; Tercian, S.; Drancourt, M.; Raoult, D. (2004). *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.** 42: 5427-5428.
- Huang, L.J.; Chen, H.P.; Chen, T.L.; Siu, L.K.; Fung, C.P.; Lee, F.Y.; Liu, C.Y. (2006). Secondary *Aeromonas* peritonitis is associated with polymicrobial ascites culture

- and absence of liver cirrhosis compared to primary *Aeromonas* peritonitis. **APMIS** 144: 772-778.
- Huddleston, J.R.; Brokaw, J.M.; Zak, J.C.; Jeter, R.M. (2013). Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer among environmental *Aeromonas* species. **Syst. Appl. Microbiol.** 36: 224-234.
- Huys, G.; Cnockaert, M.; Swings, J. (2005). *Aeromonas culicicola* Pidiyar *et al.* 2002 is a latter subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner *et al.* 1987. **Syst. Appl. Microbiol.** 28:604-609.
- Janda, J. M. (1991) Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. **Clin Microbiol Rev.** 4:4-397-410.
- Janda, J.M.; Guthertz, S.; kokka, R.P.; Shimada, T. (1994). The susceptibility of S-layer-positive and S-layer-negative *Aeromonas* strains to complement mediated lysis. **Microbiology.** 140: 2899-2905.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (1996). Human pathogens, p. 151-173. In B. Austin, M. Altwegg. P. J. Gosling, S. Joseph (ed.). The genus *Aeromonas*. **John Wiley & Sons Ltda.** West Sussex, England.
- Janda, J.M. & Abbott, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clin. Infect. Dis.** 27: 332-344.
- Janda, J.M. & Abbott, S.L. (2006). New gram-negative enteropathogens: fact or fancy? **Rev. Med. Microbiol.** 17: 27-37.
- Janda J.M. & Abbott, S.L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. **Clin. Microbiol.** 23(1):35. DOI 10.1128/CMR.00039-09.

- Jangid, K.; Kong, R.; Patole, M.S.; Shouche, Y.S. (2007). LuxRI homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. **BMC Microbiol.** 7: 1-11.
- Jekel, M. & Wacernagel, W. (1995). The periplasmic endonuclease I of *Escherichia coli* has amino-acid sequence homology to the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*. **Gene.** 154: 55-59.
- Joseph, S.W. & Carnahan, A.M. (2000). Update on the Genus *Aeromonas*. **ASM News.** 66:218-221.
- Kacian, D.L. & Spiegelman, S. (1974). Use of micrococcal nuclease to monitor hybridization reactions with DNA. **Anal. Biochem.** 58: 534-540.
- Kageyama, M. (1970). Nucleases of *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 16:61-67.
- Kanamori, N.; Sakabe, K.; Okazaki, R. (1973). Extracellular nucleases of *Bacillus subtilis*. I. Purification and properties. **Biochim. Biophys. Acta.** 335: 155-172.
- Kawagishi, I.; Okunishi, L.; Homma, M.; Imae, Y. (1994). Removal of the periplasmic Dnase before electroporation enhances the efficiency of transformation in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. **Microbiology** 140: 2355-2361.
- Kelleher, A. & Kirov, S. M. (2000). *Rattus norvegicus*: not a model for *Aeromonas*-associated gastroenteritis in man. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 28: 313-318.
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J.E. (2009). Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre. **Nat. Protoc.** 4: 363-371.
- Khan, M. I.; Walters, G.; Metcalfe, T. (2007). Bilateral endogenous endophthalmitis caused by *Aeromonas hydrophila*. **Eye.** 21: 1244-1245.
- Kirov, S.M.; Castrisios, M.; Shaw, J.G. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. **Infect. Immun.** 72: 1939-1945.

- Kleanthous, C.; kuhlmann, U.C.; Pommer, A.J.; Ferguson, N.; Radford, S.E.; Moore, G.R.; James, R.; Hemmings, A.M. (1999). Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. **Nat. Struct. Biol.** 6: 243-252.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. (2001). **Diagnóstico Microbiológico**, Editora Médica e Científica Ltda., RJ. 1465p.
- Kopp, J.; Bordoli, L.; kiefer, F.; Schwede, T. (2007). Assessment of CASP7 prediction for template-based modeling targets. **Proteins.** 69: 38-56.
- Kovacevik, S.; Veal, L.E.; Hsiung, H.M.; Miller, J.R. (1985). Secretion of Staphylococcal nuclease by *Bacillus subtilis*. **Jour. Bacteriol.** 162: 521-528.
- Kristjansson, J.K. (1989). Thermophilic organisms as sources of the thermostable enzymes. **Trends Biotechnol.** 7:349-353.
- Küpfer, M.; Kuhnert, B.; Korezak, R.; Peduzzi, R.; Demarta, A. (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56:2743:2751.
- Ku, W.Y.; Liu, Y.W.; Hsu, Y.C.; Liao, C.C.; Liang, P.H.; Yuan, H.S.; Chak, K.F. (2002). The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis. **Nucleic Acids Res.** 30: 1670-1678.
- Kunimoto, D.; Rennie, R.; Citron, D.M.; Goldstein, E.J.C. (2004). Bacteriology of a bear bite wound to a human: case report. **J. Clin. Microbiol.** 42: 3374-3376.
- Kunitz, M. (1950). Crystalline desoxyribonuclease. I. Isolation and general properties: spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. **J. Gen. Physiol.** 33: 349-355.

- Lachica, R.V.F.; Hoeprich, P.D.; Franti, C.E. (1972). Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic Well-agar-difusion technique. **Appl. Microbiol.** 24: 920-923.
- Laclerc, H.; Schwartzbrod, L.; Dei-Cas, E. (2002). Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit. Rev. Microbiol.** 28: 371-409.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Laskowski, M. (1966) in G.L. Cantoni and D.R. Davies (Editors), **Procedures in nucleic acid research**, Harper and Row, New York. p85.
- Laskowski, M. (1967). DNase and their use in studies of primary structure of nucleic acids. **Adv. Enzymol.** 29: 165-220.
- Laskowski, M. (1985). Nucleases: historical perspectives. In: Nucleases (Linn, S.M. and Roberts, R.J., Eds). p 21. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY.
- Lau, P.P. & Gray, H.B. (1979). Extracellular nuclease of *Alteromonas espejiana* BAL 31 IV. The single strand-specific deoxyribonuclease activity as a probe for regions of altered secondary structure in negatively and positively supercoiled closed circular DNA. **Nucleic Acids Res.** 6: 331-357.
- Legerski, R.J.; Hodnett, J.L.; Gray Jr., H.B. (1978) Extracellular nucleases of *Pseudomonas* BAL 31 III. Use of the double-strand deoxyriboexonuclease activity as the basis of a convenient method for the mapping of fragments of DNA produced by cleavage with restriction enzymes. **Nucleic Acids Res.** 5: 1445-1464.
- Leung, K.Y. & Stevenson, R.M. (1998). Tn5-induced protease deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. **Infect. Immun.** 56: 2639-2644.

- Li, C.L.; Hor, L.I.; Chang, Z.F.; Tsai, L.C.; Yang, W.Z.; Yuan, H.S. (2003). DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. **EMBO J.** 22: 4014-4025.
- Li, Y.; Liu, Y.; Zhou, Z.; Huang, H.; Ren, Y.; Zhang, Y.; Li, G.; Zhou, Z.; Wang, L. (2011). Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. **J. Bacteriol.** 193: 3389-3390.
- Lim, Y.L. & Chan, K.G. (2014). The complete genome sequence of *Aeromonas hydrophila* – a quorum sensing strain isolated from compost. Submitted in 25-MAR-2014. Access in [http:// www.ncbi.gov/genome/annotation_prok/](http://www.ncbi.gov/genome/annotation_prok/)
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods.** 4: 402-408.
- Loewy, A. G.; Santer, U. V.; Wieczorek, M.; Blodgett J. K.; Jones, S. W. Cheronis, J. C. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase of *Aeromonas hydrophila*. **J. Biol. Chem.** 268: 9071-9078.
- Lu, C.H.; Yu, C.S.; Chien, Y.T.; Huang, S.W. (2014). EXIA2: web server of accurate and rapid protein catalytic residue prediction. **Biomed. Res. Int.** doi: 10.1155/2014/807839.
- Lucena, R.F. (2007). Isolamento e caracterização de *Aeromonas* em carcaças suínas. **Dissertação de Mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.
- Maeda, M. & Taga, N. (1976a). Extracellular nuclease produced by a marine bacterium. I. Extracellular deoxyribonuclease formation by marine *Vibrio* sp. **Can. J. Microbiol.** 22: 1437-1442.
- Maeda, M. & Taga, N. (1976b). Extracellular nuclease produced by a marine bacterium. II. Purification and properties of a extracellular nuclease from a marine *Vibrio* sp.

Can. J. Microbiol. 22: 1437-1442.

Maeda, M. & Taga, N. (1974). Occurrence and distribution of deoxyribonucleic acid-hydrolyzing bacteria in sea water. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 14: 157-169.

Marchler-Bauer, A.; Derbyshire, M.K.; Gonzales, N.R.; Lu, S.; Chitsaz, F.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; He, J.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Lanczycki, C.J.; Lu, F.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; Thanki, N.; Wang, Z.; Yamashita, R.A.; Zhang, D.; Zheng, C.; Bryant, S.H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res.** 43:222-226.

Marcus, H.; Ketley, J.M.; Kaper, J.B.; Holmes, R.K. (1990). Effects of DNase production, plasmid size, and restriction barriers on transformation of *Vibrio cholerae* by electroporation and osmotic shock. **FEMS Microbiol. Lett.** 68: 149-154.

Marian, M.C. (1990). Virulence factors in motile *Aeromonas* species. **J. Appl. Microbiol.** 69: 1-16.

Martins, L.M.; Marquez, R.F.; Yano, T. (2002). Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food in human infection. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** 32: 237-242.

Martínez-Murcia, A.J.; Benlloch, S.; Collins, M.D. (1992). Phylogenetic Interrelationships of Members of the Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing: Lack of Congruence with Results DNA/DNA Hybridizations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42: 412-421.

Martínez, M.J.; Simon-Pujol, D.; Congregado, F.; Merino, S.; Rubires, X.; Tomás, J.M. (1995). The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. **FEMS Microbiol. Lett.** 128: 69-74.

Meiss, G.; Franke, I.; Gimadutdinow, O.; Urbanke, C.; Pingoud, A., (1998). Biochemical characterization of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 non-specific

- nuclease NucA and its inhibitor NuiA. **Eur J Biochem.** 251: 924-934.
- Mencacci, A.; Ceni, E.; Mazolla, R.; Farinelli, S.; D'Alo, F.; Vitali, M.; Bistoni, F. (2003). *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. **J. Med. Microbiol.** 52: 727-730.
- Merino, S. & Tomás, J. M. (2010). Bacterial capsules and evasion of immune response. In **Encyclopedia of life Science**, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 3rd edition.
- Miller, M.D.; Tanner, J.; Alpaugh, M.; Benedik, M.J.; Krause, K.L. (1994). A structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. **Nature Struct. Biol.** 1: 461-468.
- Miller, M.D., Cai, J., Krause, K.L. (1999). The active site of *Serratia* endonuclease contains a conserved magnesium-water cluster. **J. Mol. Biol.** 288: 975-987.
- Miñana-Galbis, D. (2002). Biochemical Identification and Numerical Taxonomy of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Clinical Samples in Spain. **J. Appl. Microbiol.** 93: 420-430.
- Mishra, N.C. (2000). **Nucleases: molecular biology and applications**. 1^a ed. Michigan. Wiley Interscience. p 314.
- Miyake, M.; Iga, K.; Izumi, C.; Miyagawa, A.; Kobashi, Y.; Konishi, T. (2000). Rapidly progressive pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* shortly after near-drowning. **Intern. Med.** 39: 1128-1130.
- Monaghan, S.F.; Anjaria, D.; Mohr, A.; Livingston, D.H. (2008). Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromona hydrophila* after crush injury of the lower extremity. **Surg. Infect.** 9: 459-467.
- Moulard, M.; Condemine, G.; Robert-Baudouy, J. (1993). Search for the function of the nuclease NucM of *Erwinia chrysanthemi*. **FEMS Microbiol. Lett.** 112: 99-104.

- Moulard, M.; Condemine, G.; Nasser, W.; Robert-Baudouy, J. (1995). Purification and characterization of the nuclease NucM of *Erwinia chrysanthemi*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1262: 133-138.
- Mulcahy, H.; Charron-Mazenod, L.; Lewenza, S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. **Environ. Microbiol.** 12: 1621-1629.
- Muller, A.; Sandine, W.E.; Elliker, P.R. (1971). Extracellular nuclease in the genus *Lactobacillus*. **Jour. Bacteriol.** 108: 604-606.
- Murata, H.; Yoshimoto, H.; Masuo, M.; Tokuda, H.; Kitamura, S.; Otsuka, Y.; Miura, Y. (2001). Fulminant pneumonia due *Aeromonas hydrophila* in a man with chronic renal failure and liver cirrhosis. **Int. Med.** 40: 118-123.
- Muro-Pastor, A.M.; Flores, E., Herrero; A. Wolk, C.P. (1992). Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from *Anabaena* sp. PCC 7120. **Mol. Microbiol.** 6: 3021-3030.
- Nakajima, H.; Itho, K.; Arakawa, E.; Inoue, M.; Mori, T.; Watanabe, H. (1994). Degradation of a polymerase chain reaction (PCR) product by heat-stable doxyribonuclease (DNase) produced from *Yersinia enterocolitica*. **Microbiol. Immunol.** 38: 153-156.
- Nakamura, A.; Koide, Y.; Miyazaki, H.; Kitamura, A.; Masaki, H.; Beppu, T.; Uozumi, T. (1992). Gene cloning and characterization of a novel extracellular ribonuclease of *Bacillus subtilis*. **Eur. J. Biochem.** 209:121-127.
- Nakasone, N.; Toma, C.; Song, T.; Iwanaga, M. (2004). Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 237: 127-132.
- Nam, I.Y.; Myung, H.; Joh, K. (2004). Molecular cloning, purification, and

- characterization of an extracellular nuclease from *Aeromonas hydrophila* ATCC14715. **J. Microbiol. Biotechnol.** 14: 178-181.
- Nam, I.Y. & Joh, K. (2007). Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. **Jour. Microbiol.** 45: 297-304.
- Nestle, M. & Roberts, W.K. (1969). An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. II. Specificity of the enzyme. **J. Biol. Chem.** 244: 5219-5225.
- Neru, H.C., Hepell, L.A. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. **J. Biol. Chem.** 240: 3685-3692.
- Neves, M.S.; Nunes, M.P.; Ricciardi, I.D. (1990). Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Protec.** 53: 78-80.
- Newland, J.W.; Green, B.A.; Foulds, J.; Holmes, R.K. (1985). Cloning of extracellular DNase and construction of a DNase-negative strain of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** 47: 691-696.
- Nhung, P.; Hata, K.; Ohkusu, M.; Noda, M.; Shah, M. M.; Goto, K.; Ezaki, T. (2007). Use the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. **Int. J. Evol. Microbiol.** 57:1232-1237.
- Nicieza, R.G.; Huergo, J.; Connolly, B.A.; Sanchez, J. (1999). Purification, characterization and role of nuclease and serine protease in *Streptomyces* differentiation. **J. Biol. Chem.** 274: 20366-20375.
- Nieto, T. P. & Ellis A. E. (1986). Characterization of extracellular metallo- and serine-protease of *Aeromonas hydrophila* strain B51. **J. Gen. Microbiol.** 132:1975-9.
- Nishimura, A., Morita, A., Nishimura, Y., Sugino, Y. 1990. A rapid and highly efficient

- method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucl. Acids Res.** 18: 6169.
- Palchevsky, V. & Finkel, S.E. (2006). *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and use of DNA as a nutrient. **J. Bacteriol.** 188: 3902-3910.
- Palchevsky, V. & Finkel, S.E. (2009). A role for single-strand Exonucleases in the use of DNA as a nutrient. **J. Bacteriol.** 191: 3712-3716.
- Park, H.; Hwang, K.Y.; Oh, K.H.; Kim, Y.H.; Lee, J.Y.; Kim, K. (2008). Discovery of novel alpha-glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure. **Bioorg. Med. Chem.** 16: 284-292.
- Pavlopoulou, A. & Michalopoulos, I. (2011). State-of-the-art bioinformatics protein structure prediction tools. **Int. J. Mol. Med.** 28: 295-310.
- Peant, B., LaPointe, G. 2004. Identification and characterization of a conserved nuclease secreted by strains of the *Lactobacillus casei* group. **J. Appl. Microbiol.** 96: 367-374.
- Pei, J. & Grishin, N.V. (2007). PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. **Bioinformatics.** 23: 802-808.
- Pemberton, J.M.; Kidd, S.P.; Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiol. Lett.** 152: 1-10.
- Pepe, C.M.; Eklund, M.W.; Strom, M.S. (1996). Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. **Mol. Microbiol.** 19: 857-869.

- Pereira, C.S.; Possas, C.A.; Viana, C.M.; Rodrigues, D.P. (2004). *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (Perna perna) In Natura e Pré-Cozidas no Rio de Janeiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 24: 562-566.
- Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminant signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**. 8: 785-786.
- Pidiyar, V.; Kasnowski, A.; Narayan, N.B.; Shouche, Y.S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 32: 1723-1728.
- Pimkin, M.; Miller, C.G.; Blakesley, L.; Oleykowski, C.A.; Kodali, N.S.; Yeung, A.T. (2006). Characterization of a periplasmic S1-like nuclease coded by the *Mesorhizobium loti* symbiosys island. **BBRC**. Available on line at www.sciencedirect.com.
- Pinchuk, G.E.; Ammons, C.; Culley, D.E.; Li, S.M.; McLean, J.S.; Romine, M.F. (2008). Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella* spp.: ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. **Appl. Environ. Microbiol.** 74:1198-1208.
- Pinna, A.; Sechi, L.A.; Zanetti, S.; Usai, D.; Carta, F. (2004). *Aeromonas caviae* keratitis associated with contact lens wear. **Ophthalmology**. 111: 348-351.
- Pridgeon, J.W.; Zhang, D.; Zhang, L. (2014). Complete genome sequence of a moderately virulent *Aeromonas hydrophila* strain, pc104A, isolated from soil of a catfish pond in west Alabama. **Genome Announc.** 3: 1-5.
- Pridgeon, J.W.; Zhang, D.; Zhang, L. (2014a). Complete genome sequence of the highly virulent *Aeromonas hydrophila* AL09-71, isolated from diseased channel catfish in west Alabama. **Genome Announc.** 3: 1-6.

- Pruitt, K.D.; Tatusova, T.; Maglott, D.R. (2007). NCBI reference sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence data base of genomes. **Nucleic Acids Res.** 35: 61-65.
- Przykorska, A.; Kuligowska, E.; Gerhart, E.; Wagner, H.; Szarkowski, J.W.; Nordstrom, K. (1989) Two plant nucleases as tools for structural analysis of RNA. **Biochemistry** 28: 1585-1588.
- Pukatzki, S.; Ma, A.T.; Sturtevant, B.; Krastins, D.; Sarracino, W.C.; Nelson, J.F.; Heidelberg, J.F.; Mekalamos, J.J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 103: 1528-1533.
- Puri, P.; Bansal, V.; Dinakaran, S.; Kayarkar, V.V. (2003). *Aeromonas sobria* corneal ulcer. **Eye.** 17:104-105.
- Qian, B.; Raman, S.; Das, R.; Bradley, P.; McCoy, A.J.; Read, R.J.; Baker, D. (2007). High-resolution structure prediction and the crystallographic phase problem. **Nature.** 450: 259-264.
- Raaijmakers, H.; Vix, O.; Toro, I.; Golz, S.; Kemper, B.; Suck, D. (1999). X-ray structure of T4 endonuclease VII: a DNA junction resolvase with a new fold and unusual domain-swapped dimer architecture. **EMBO J.** 18: 1447-1458.
- Rangarajan, E. & Shankar, V. (1999). Extracellular nuclease from *Rhizopus stolonifer*: purification and characteristics of single strand preferential deoxyribonuclease activity. **Biochim. Biophys. Acta.** 1473: 293-304.
- Rava, P.; & Hussain, M.M. (2007). Acquisition of triacylglycerol transfer activity by microsomal triglyceride transfer protein during evolution. **Biochemistry.** 46: 12263-12274.
- Reith, M.E; Singh, R.K.; Curtis, B.; Boyd, J.M.; Bouevitch, A.; Kimball, J;

- Munholland, J.; Murphy, C.; Sarty, D.; Williams, J.; Nash, J.H.; Johnson, S.C.; Brown, L.L. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. **BMC Genomics**. 9: 427.
- Rhodes, G.; Huys, G.; Swings, J.; Megann, P.; Hiney, M.; Smith, P.; Pickup, R.W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmid between aeromonads in hospital and aquiculture environments: Implication of Tn/721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Appl. Environ. Microb.** 66: 3883-3890.
- Rodríguez, L.A.; Ellis, A.E.; Nieto, T.P. (1992). Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B23: all are lethal for fish. **Microb. Pathog.** 13:17-24.
- Rosenthal, A.L. & Lacks, S.A. (1977). Nuclease detection in SDS-Polyacrilamide gels electrophoresis. **Anal. Biochem.** 80: 76-90.
- Saad, S.M.I.; Iaria, S.T.; Furlanetto, S.M.P. (1995). Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Microbiol.** 26: 22-27.
- Saavedra, M.J.; Figueras, M.J.; Martínez-Murcia, A.J. (2006). Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2481-2487.
- Saavedra, M. J.; Perea, P.; Fontes, M. C.; Martins, C.; Martinez-Murcia, A. (2007). Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new member of the species *Aeromonas allosacharophila*. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 91: 159-167.
- Sadovski, A.Y. & Levin, R.E. (1969). Extracellular nuclease activity of fish spoilage bacteria, fish pathogens, and related species. **Appl. Microbiol.** 17: 787-789.
- Saha, T.; Chakrabati, T. (2006). *Aeromonas sharmana* sp. Nov., isolated from a warm spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 1905-1909.

- Salikhova, Z.Z.; SoKolova, R.B.; Ponomareva, A.Z.; Yusupova, D.V. (2001).
Endonuclease from *Proteus mirabilis*. App. Biochem. Microbiol. 37: 36-40.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold
Spring Harbor Lab. Press.
- Seper, A.; Fengler, V.H.I.; Roier, S.; Wolinsk, H.; Kohlwein, S.D.; Bishop, A.L.;
Camilli, A.; Reidl, J.; Schild, S. (2011). Extracellular nuclease and extracellular
DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. **Mol. Microbiol.**
82: 1015-1037.
- Seshadri, R.; Joseph, S.W.; Chopra, A.K.; Sha, J.; Shaw, J.; Graf, J.; Haft, D.; Wu, M.;
Ren, Q.; Rosovitz, M.J.; Madupu, R.; Tallon, L.; Kim, M.; Jin, S.; Vuong, H.;
Stine, O.C.; Ali, A.; Horneman, A.J.; Heidelberg, J.F. (2006). Genome Sequence
of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **J. Bacteriol.** 188:
8272-8282.
- Sohn, H.J.; Nam, D.N.; Kim, Y.S.; Paik, H.J. (2007). Endogenous *Aeromonas*
hydrophila endophthalmitis in an immunocompromised patient. **Korean J.**
Ophthamol. 21: 45-47.
- Soler, L.; Yáñez, M.A.; Chaacon, M.R.; Aguilera-Arreola, M.G.; Catalán, V.;
Figueroas, M.J.; Martínez-Murcia, A.J. (2004). Phylogenetic analysis of the
genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **Int. J. Syst. Evol.**
Microbiol. 54: 1511-1519.
- Sumby, P.; Barbian, K.D.; Gardener, D.J.; Whitney, A.R.; Welty, D.M.; Long, R.D.;
Bailey, J.R.; Parnell, M.J.; Hoe, N.P.; Adams, G.G.; DeLeo, F.R.; Musser, J.M.
(2004). Extracellular deoxyribonuclease made by group A Streptococcus assists
pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. **PNAS.** 102:
1679-1684.

- Takahashi, M. & Uchida, T. (1978). Purification and properties of extracellular exonuclease from *Thermus thernophilus* HB8. **J. Biochem.** 83: 1521-1532.
- Taniuchi, H.; Anfinsen, C.B.; Sodja, A. (1967). The amino acid sequence of an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. **J. Biol. Chem.** 242: 4752-4758.
- Tang, J.; Zhou, R.; Shi, X.; Kang, M.; Wang, M.; Wang, H.; Chen, H. (2008). Two thermostable nucleases coexisted in *Sthaphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis an *in vitro* expression. **FEMS Microbiol. Lett.** 284: 176-183.
- Tequianes-Bravo, L.; Pérez-Gonzálvez, D.A.; Gonzálvez-Malváez, M.M.; Flores-Pimentel, M.; Marroquín-Segura, R. (2005). Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, em muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. **Bioquimia (México)**.30: 23-29.
- Tekedar, H.C.; Waldbieser, G.C.; Karsi, A.; Liles, M.R.; Griffin, M.J.; Vamenta, S.; Sonstegard, T.; Hossain, M.J.; Shroeder, S.; Khoo, L.; Lawrence, M.L. (2013). Complete genome sequence of a cannell catfish epidemic isolate, *Aeromonas hydrophila* strain ML09-119. **Genome Annouc.** 5: 1-5.
- Thelestam, M. & Ljungh, A. (1981). Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alfa- and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 34: 949-956.
- Tomás, J.M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiol.** 1: 1:22.
- Turner, P.; Mano, G. & Karlsson, E.N. (2007). Potential and utilization of thermostable enzymes in biorefining. **Microb. Cell Fact.** 6:1-23.
- Urbanczyk, H.; Ast, J.C.; Higgins, M.J.; Carson, J. & Dunlap, P.V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio*

- wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57:2823-2829.
- USEPA. (2005). Drinking water contaminant candidate list. Federal Register, February 24, 2005. Volume 70, Number 36: 9071-9077. Available from [[http: www.epa.gov/fedrgstr/epa-water/2005/February/day24/w3527.htm](http://www.epa.gov/fedrgstr/epa-water/2005/February/day24/w3527.htm)] (24 de fevereiro).
- Vieille, C. & Zeikus, J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, use, and molecular mechanism for thermostability. **Microbiol. Mol. Biol. R.** 65:1-43.
- Von Tigerstrom, R.G. (1980). Extracellular nuclease of *Lysobacter enzymogenes*: production and purification and characterization of an endonuclease. **Can. J. Biochem.** 26: 1029-1032.
- Voss, L. M.; Rhodes, K. M.; Johnson, k. A. (1992). Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: an environmental disease. **Mayo Clin. Proc.** 67: 422-427.
- Xu, X.J.; Ferguson, M.R.; Popov, V.L.; Houston, C.W.; Peterson, J.W.; Chopra, A.K. (1998). Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. **Infect. Immun.** 66: 3501-3509.
- Zacaria, J. 2009. **Estudo de proteases extracelulares de *Aeromonas spp.*** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Zacaria, J.; Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Echeverrigaray, S. (2010). Diversity of extracellular proteases among *Aeromonas* determined by zimogram analysis. **J. Appl. Microbiol.** 109: 212-219.
- Zanella, J.F.P. (2002). Avaliação da incidência de *Aeromonas* em trabalhadores de aviaries e estudo da resposta ao contato permanente com *Aeromonas*. **Dissertação**

- de Mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Zhang, X. & Song, Q. (2008). Characterization of a novel non-specific nuclease from thermophilic bacteriophage GBSVI. **BMC Biotechnol.** 8: 43.
- Zittle, C.A.; Della Monica, E.S.; Custer, J.H. (1956). Effect of certain salts on precipitation of casein by calcium chloride and heat. **J Dairy Sci.** 40:280-288.
- Zucolotto, T.; Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Echeverrigaray, S. (2006). *Aeromonas* Growth Under Low Temperatures. In: A. Mendez-Vilas. (Org.) **Modern Multidisciplinary Appl. Microbiol.: Exploiting Microbes and Their Interactions.** Weinheim: Willey-VCH. p. 276-280.
- Wang, Z.; Li, J.; Vinogradov, E.; Altman, E. (2006). Structural studies of the core region of *Aeromonas salmonicida* sub. *salmonicida* lipopolysaccharide. **Carbohydr. Res.** 341: 109-117.
- Wang, Z.; Liu, X.; Li, J.; Altman, E. (2008). Structural characterization of the O-chain polysaccharide of *Aeromonas caviae* ATCC15468 lipopolysaccharide. **Carbohydr. Res.** 343: 483-488.
- Wass, M.N.; Kelley, L.A.; Sternberg, M.J. (2010). 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. **Nucleic Acids Res.** 38: 469-473.
- Watanabe, N.; Morita, K.; Furukawa, T.; Manzoku, T.; Endo, E.; Kanamori, M. (2004). Sequence and Analysis of Amplified DNA Fragments Containing the Region Encoding the Putative Lipase Substrate-Binding Domain and Genotyping of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 145-151.
- Watson, J.D.; Laskowski, R.A.; Thornton, J.M. (2005). Predicting protein function from sequence and structural data. **Curr. Struct. Biol.** 15: 275-284.
- Weisner, R.J.; Hendrixon, D.R.; DiRita, V.J. (2003). Natural transformation of

- Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system. **J. Bacteriol.** 185: 5408-5418.
- Whitfield, C. & Valvano, M.A. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. **Adv. Microbiol. Physiol.** 35: 135-246.
- Windgassen, M.; Urban, A.; Jaeger, K.E. (2000). Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Lett.** 193: 201-205.
- Worthington, K.; Worthington, V. (2011). Nuclease S1 assay, in *Worthington Enzyme Manual*. **Disponível (online)** <http://www.worthington-biochem.com> (18 de fevereiro).
- Wu, S.I.; Lo, S.K.; Shao, C.P.; Tsai, H.W.; Hor, L.I. (2001). Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreign DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 82-88.
- Wu, C.H.; Huang, H.; Aminska, L.; Castro-Alvarez, J.; Chen, Y.; Hu, Z.Z.; Ledley, R.S.; Lewis, K.C.; Mewes, H.W.; Orcutt, B.C.; Suzek, B.E.; Tsugita, A.; Vinayaka, C.R.; Yeh, L.S.; Zhang, J.; Barker, W.C. (2002). The protein information resource: an integrated public resource of functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res.** 30: 35-37.
- Yang, W. (2011). Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. **Q. Rev. Biophys.** 44: 1-93.
- Yu, H.B.; Zhang, Y.L.; Lau, Y.L.; Yao, F.; Vilches, S.; Merino, S.; Tomas, J.M.; Howard, S.P.; Leung, K.Y. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4469-4477.

9. ANEXOS

Anexo I. Análise de alinhamento da sequência nucleotídicas correspondente ao gene *dns* de *A. hydrophila* IBAer119 em relação aos seus homólogos.

	10	20	30	40	50
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	-----	ATGTTTCG	-----	TCCCCTGC	TCTCTCTCGCCC
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	-----	ATGCGTTTCA	-----	TCTCCTCCCTCGCCCTGACCC	
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	-----	ATGCGTCTCA	-----	TCTTTCCCTCGCCCTGACCC	
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	-----	ATGTTTCG	-----	TCCCCTGC	TCTCTGTCGCCC
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	-----	ATGTTTCG	-----	TCCCCTGC	TCTCTCTCGCCC
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	-----	ATGTTTCG	-----	TCCCCTGC	TCTCTCTCGCCC
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	-----	ATGTTTCG	-----	TCCCCTGC	TCTCTCTCGCCC
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	-----	ATGTTTCG	-----	TCCCCTGT	TTTCGTTACCCC
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	-----	ATGTTTCG	-----	CCCTCTGC	TTTCGTTACCCC
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	-----	ATGTTTCG	-----	CCCTCTGA	TTTCCTCTGCCC
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	-----	ATGTTTCG	-----	CCCTCTGC	TCTCCCTCTGCC
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	ATGTCTCGCC	CCCTCTGC	TTTCGTTACCCC	TCTCTCTCGCCC	
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	-----	ATGTTTCG	-----	TCTCTGT	TCACCCCTCAGTG
Clustal Consensus		** *		*	* * *
	60	70	80	90	100
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	TG	---ACC---	CTGCTGGT	CAGTCTGCCCC	TGCATG
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	TG	CTGGCCGGTTT	ACCCTGCTCAGCG	CCCCCCTGCACG	
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	TG	CTGGCCGGTTT	CCGCTGCTCAGCG	CGCCCCCTGCATG	
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	TG	---ACT---	CTGTTGGT	CAGCCTGCCCTTCATG	
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	TG	---ACC---	CTGCTGGT	CAGTCTGCCCC	TGCATG
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	TG	---ACC---	CTGCTGGT	CAGTCTGCCCC	TGCATG
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	TG	---ACC---	CTGCTGGT	CAGTCTGCCCC	TGCATG
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	TG	---GCC---	CTGCTGGT	CAGCCTGCCCTGCATG	
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	TG	---GCC---	CGGCTGGT	CAGCCTGCCCTGCATG	
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	TG	---GCC---	CTGCTGGT	CAGTCTGCCCC	GGCCCATGCCAGGCC
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	TG	---GCC---	CTGCTGGT	CAGCGCCCC	GGCCCATGCCAGGACA
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	TG	---ACC---	CTGCTGGT	CAGTACGCC	CTCCAGGCGCAAGAGG
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	TC	---GGC---	TTGCTCAT	CAGCCTGCCGTT	CATCAGCTCGCCCC
Clustal Consensus	*		**	*	*
	110	120	130	140	150
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	---	CCCAGACTTTTCGCGCCGCCAAACAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	---	CCCAGACCTTTTCGCGAAGCCAAAGCAGGATCTGGTGAAGCTCTACCG			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	---	CCCAGACCTTTTCGCGAAGCCAAAGCAGGATCTGGTGAAGCTCTATCCA			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	---	CCCAGACTTTTCGCAACGCCAAGCAGGATCTGGTCAAGCTCTATAA			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	---	CCCAGACTTTTCGCGCCGCCAAACAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	---	CCCAGACTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	---	CCCAGACTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	---	CCCAGACTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	---	CCCAGACCTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	---	CCCAGACCTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	---	TCCAGACCTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	---	CCCAGACCTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGTCAAGCTCTATCA			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	CAGG	CCCAGACCTTTTCGCGCCGCCAAGCAGGATCTGAACCGCCTCTATCA			
Clustal Consensus		*****	*	*	*
	160	170	180	190	200
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	GGAT	CACCCGGT	---	TACCTTCTACTGCGGCTGCAAGATTGACTATC	
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	CAGCC	AGCCTGCGGT	CACCACTTCTACTGCGGCTGTGACATCGACTATC		
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	GAGCC	AGCCCGCTGT	CACCACTATCTACTGCGGTTGCAACATCGACTATC		
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	AACCC	AGCCCCAGT	CACCACTTCTACTGCGGCTGCGCATTCGCTATC		
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	GGAT	CACCCGGT	---	CACCTTCTATTGCGGCTGCAAGATTGACTATC	
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	GGAT	CACCCGGT	---	CACCTTCTATTGCGGCTGCAAGATTGACTATC	
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	GGAT	CACCCGGT	---	CACCTTCTATTGCGGCTGCAAGATTGACTATC	
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	GGAT	CACCCGGT	---	CACCTTCTATTGCGGCTGCAAGATTGACTATC	
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	GGAT	CACCCGT	---	CACCTTCTACTGCGGCTGCAAGATTGACTATC	
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	GAGCC	ACCCAC	---	CACCTTCTATTGCGGCTGCAACATCAAGTTCA	
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	GAGCC	ACCCGT	---	CACCTTCTACTGCGGCTGCAACATCAAGTTCA	
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	GAGCC	ATCCAG	---	CACCTTCTACTGCGGCTGCAACATCAAGTTCA	
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	GAGCC	ACCCAC	---	CACCTTCTATTGCGGCTGCAACATCAAGTTCA	
Clustal Consensus	** *			***	*

	210	220	230	240	250
<i>A. hydrophila</i> IBAe119		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715		AGGGCAAGAAAAATGAGCCCGGATCTGGCCAGTTGCGGCTATGAGCCGCGC			
CP007567.1- <i>A. media</i> WS		GCGGCAAGCAGATGGCCCTGACTGGGAGAGCTGCGGCTACCTGCCGCGC			
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1		GCGGCAAGAGATGGCCCCGACTGGGAGAGCTGCGGCTACCTGCCGCGC			
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636		GCGGCAAGCAGATGGCGCGGAGCTGGGAGAGCTGCGGCTACCTGCCGCGC			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		GCGGCAAGCAGATGGCCCCGACTGGGAGAGCTGCGGCTACCTGCCGCGC			
Clustal Consensus	***** * *** ** * * * * * * * *				
	260	270	280	290	300
<i>A. hydrophila</i> IBAe119		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTAGTCCCCGC			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		AAGCAGGCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		AAGCAGCCCCAAGCGCGCCGCCCGCATCGAGTGGGAACACGTGGTCCCGGC			
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715		AAGCAGGCCAAGCGCGCCAAACCGCATAGAGTGGGAACACGTGGTGCCCTGC			
CP007567.1- <i>A. media</i> WS		AAGCAGGCCAATCGCGCCTCTCGCATCGAGTGGGAGCACGTGGTGCCCGC			
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1		AAACAGGCCGAGCGGGCCTCCCGCATCGAATGGGAGCACGTGGTGCCCGC			
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636		AAGCAGGCCAATCGCGCGCCCGCATCGAGTGGGAGCACGTGGTGCCCGC			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		AAGCAGGCCAATCGCGCCTCTCGCATCGAGTGGGAGCACGTGGTGCCCGC			
Clustal Consensus	** *** * * * * * * * * * * * * * *				
	310	320	330	340	350
<i>A. hydrophila</i> IBAe119		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAGCAGGGTGGTCGCAAGA			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTGCAATGCTGGCAGGCTGGCGGTGCGCAAGA			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTCAAGTGCTGGCAGCAGGGCGGTGCGCAAGA			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		CTGGGAATTTGGCCATCAACTGCAGTGCTGGCAGCAGGGTGGCCGCAAAA			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAACAGGGTGGCCGCAAGA			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAACAGGGTGGCCGCAAGA			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAACAGGGTGGCCGCAAGA			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAGCAGGGCGGTGCGCAAGA			
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715		CTGGGAATTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAGCAGGGTGGTCGCAAGA			
CP007567.1- <i>A. media</i> WS		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTCCAGTGCTGGCAGGAGGGCGGGCGCAAGA			
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTCCAGTGCTGGCAGGACGGGGTTCGCAAGA			
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636		CTGGGAATTTGGCCACCAGCTGCAGTGCTGGCAGGAGGGGGTTCGCAAGA			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		CTGGGAGTTTGGCCACCAGCTCCAGTGCTGGCAAGAGGGCGGGCGCAAGA			
Clustal Consensus	***** * * * * * * * * * * * * * *				
	360	370	380	390	400
<i>A. hydrophila</i> IBAe119		ACTGCGAAAAAGCGAGCCCCGAGTTCAATAAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		ACTGCGAAAAAGCGAGCCCCGAGTTCAACAAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		ACTGCGGCAA---GAGCGACGAGTTCAACCAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		ATTGTCAGCAA---GAGCGATGAGTTCAACAAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		ATTGTCGCAA---GAGCGACGAGTTCAACCAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		ATTGTCGCAA---GAGCGACGAGTTCAACCAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A		ATTGTCGCAA---GAGCGACGAGTTCAACCAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		ATTGTCGCAA---GAGCGACGAGTTCAACCAGATGGAGGGGACATGCAC			
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715		ACTGCGGCAA---GAGCGACGAGTTCAACCAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP007567.1- <i>A. media</i> WS		ACTGCGGCAA---GAGCGACGAGTTCAACAAGATGGAGGGGACATGCAC			
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1		ATTGCGGCAA---GAGCGACGAGTTCAACAGGATGGAGGGGACATGCAC			
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636		ACTGCGGCAA---GAGCGCCGAGTTCAACAAGATGGAGGGGACATGCAC			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		ACTGCGGCAA---GAGCGACGAGTTCAACAAGATGGAGGGGACATGCAC			
Clustal Consensus	* * * * * * * * * * * * * * * * * *				
	410	420	430	440	450
<i>A. hydrophila</i> IBAe119		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCCAACCTCCG			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		AACCTCTTCCCCGCCATTTGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCCAACCTCCG			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		AACCTCTTCCCCGCCGTTGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCCAACCTCCG			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTAAATGGCGATCGGGCCAACCTCCG			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGTGATCGGGCCAACCTCCG			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGTGATCGGGCCAACCTCCG			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGTGATCGGGCCAACCTCCG			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGTGATCGGGCCAACCTCCG			
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGTTGATCGGGCCAACCTCCG			
CP007567.1- <i>A. media</i> WS		AACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCCAACCTCCG			

M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	AAACCTCTTCCCTGCCATCGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCGAACTTCCG
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	AAACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCGAACTACCG
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	AAACCTCTTCCCCGCCATCGGCGAGGTGAACGGCGATCGGGCGAACTACCG
Clustal Consensus	***** *
	460 470 480 490 500
<i>A. hydrophila</i> IBAe119	
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	CTTCTCCGACTGGAATGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	CTTCTCCGACTGGAACGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	CTTCTCCGACTGGAACGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	CTTCTCCGACTGGAACGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	CTTCTCCGACTGGAACGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	CTTCTCCGACTGGAACGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	CTTCTCCGACTGGAATGGCAACCCCGGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	CTTCTCCGACTGGAACGGCAACCCCGATCAGTACGGCCAGTGCCGGATGC
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	CTTCTCCGACTGGAACGGCAAGCCGAACCCAGTACGGCAAGTGCCAGATGC
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	CTTCAGCGACTGGAACGGCAACCCGAACCCAGTACGGCAAGTGCCAGATGC
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	CTTCTCCGACTGGAACGGCAAGCCGAACCCAGTACGGCAAGTGCCAGATGC
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	CTTCTCCGACTGGAACGGCAAGCCGAATCAGTACGGCAAGTGCCAGATGC
Clustal Consensus	** ***** *
	510 520 530 540 550
<i>A. hydrophila</i> IBAe119	
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	TGGTAGACTTCAAAAATCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGGTACGG
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	TGGTGGATTTCAAGGAGCGCCGGGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGATACGG
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	TGGTGGACTTCAAGGAGCGCCGGGTGCAGCCGCCAAGGGGCTGGTACGA
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	TGGTGGATTTCAAAAATCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCTGGTACGC
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	TGGTGGACTTCAAAAATCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCTGGTACGC
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	TGGTGGACTTCAAAAATCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCTGGTACGC
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	TGGTGGACTTCAAAAATCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCTGGTACGC
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	TGGTGGATTTCAAGGAGCGTCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCTGGTACGC
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	TGGTGGACTTCAAGGATCGCCGGGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGGTGCGC
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	TGGTGGACTTCAAGGAGCGCCAGGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGGTGCGT
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	TGGTGGACTTCAAGGAGCAGCGCGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGGTGCGT
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	TGGTGGACTTCAAGGATCGCCGGGTGCAGCCGCCAAGGGGCGGGTGCGC
Clustal Consensus	**** *
	560 570 580 590 600
<i>A. hydrophila</i> IBAe119	
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	GGCCAGATTGCCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAACATGGGCTGCG
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	GGCCAGATAGCCCGTGCCTACCTCTATAGCCAGCAGTATGGGCTGCG
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGCCAGCAGTACGGACTGCG
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	GGCCAGATCGCCCGCGCTACCTCTATAGGGGAGCAGTACGGGCTGCG
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	GGCCAGATAGCCCGCTACCTCTATAGGGCCAGCAGTATGGGCTGCG
Clustal Consensus	***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	610 620 630 640 650
<i>A. hydrophila</i> IBAe119	
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	TCTGGCAGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	TCTGGCAGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGATCGCCAGTACC
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	TCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	TCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	TCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	TCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	TCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGATAGGCAGTACC
AF004392.2- <i>A. hydrophila</i> ATCC 14715	CCTCGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP007567.1- <i>A. media</i> WS	CCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
M99491.1- <i>A. hydrophila</i> CHC-1	TCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
L78266.1- <i>A. hydrophila</i> JMP636	CCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4	CCTGGCGGCGCAACAGCGTAAACTGTTGGAAGCCTGGGACAGGCAGTACC
Clustal Consensus	** *
	660 670 680 690 700
<i>A. hydrophila</i> IBAe119	
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565	CGGCCGACGGCTGGGAGTGCAGCGCAACCCCGCGATCGGCAAGCTGCAG
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17	CGGCAGAGGGCTGGGAGTGCAGCGCAACCCCGCGATCGGCAAGCTGCAG
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449	CGGCCGACGGCTGGGAGTGCAGCGCAACCCCGCGATCGGCAAGCTGCAG
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119	CGGCAGATAGCTGGGAGTGCAGCGCAACCCCGCGATCGGCAAGCTGCAG
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71	CGGCCGACGGCTGGGAGTGCAGCGCAACCCCGCGATCGGCAAGCTGCAG
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104A	CGGCCGACGGCTGGGAGTGCAGCGCAACCCCGCGATCGGCAAGCTGCAG

```

CP000462.1-A.hydrophila ATCC 7966  C G G C C G A C G G C T G G G A G T G C G A G C G C A A C C G C C G C A T C G G C A A G C T G C A G
AF004392.2-A.hydrophila ATCC 14715  C G G C C G A T G G C T G G G A G T G C G A A C G C A A T C G C C G C A T C G G C A A G T T G C A G
CP007567.1-A.media WS                C G G C C G A C C G C T G G G A G T G C G A G C G C A A C A G C C G C A T C G G C A A A C T G C A G
M99491.1- A. hydrophila CHC-1         C G G C T G A T C G C T G G G A G T G C G A G C G C A A C C G C C G T A T C G G C A A G C T G C A G
L78266.1- A. hydrophila JMP636        C G G C G G A T C G C T G G G A G T G C G A G C G C A A C C G C C G C A T C G G C A A G C T G C A A
CP006579.1-A. hydrophila 4AK4         C G G C C G A C C G C T G G G A G T G C G A G C G C A A C A G C C G C A T C G G C A A A C T G C A G
Clustal Consensus                    *****
                                     710       720       730
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
A.hydrophila IBaE119                 G G C A A T A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C A A T A A
CP002607.1-A.veronii B565            G G C A A T A C C A A T C C C T T T A T T G A A A A C A G T G C C A A T A A
CP007518.1-A.hydrophila YL17         G G C A A T A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C A G T A A
CP000644.1-A.salmonicida A449        G G C A A T A C C A A C C C C T T C A T T G A A A A G C A G T G C C G A T A A
CP005966.1-A.hydrophila ML09-119     G G C A A T A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C G A T A A
CP007566.1-A.hydrophila AL09-71      G G C A A T A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C G A T A A
CP007576.1-A.hydrophila pc104A       G G C A A T A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C G A T A A
CP000462.1-A.hydrophila ATCC 7966   G G C A A T A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C G A T A A
AF004392.2-A.hydrophila ATCC 14715  G G C A A T A C C A A T C C C T T C A T T G A A A A G C A G T G C C A A T A A
CP007567.1-A.media WS                G G C A A T A C C A A C C C C T T C A T T G A A A A G C A G T G C C A A T A A
M99491.1- A. hydrophila CHC-1         G G C A A T A C C A A T C C C T T C A T T G A A A A G C A G T G C C A A T A A
L78266.1- A. hydrophila JMP636       G G C A A T A C C A A T C C T T T C A T T G A A A A G C A G T G C C A G T A A
CP006579.1-A. hydrophila 4AK4       G G C A A C A C C A A C C C C T T T A T T G A A A A G C A G T G C C G A T A A
Clustal Consensus                    *****

```

* Indicam consenso no alinhamento entre todos os nucleotídeos avaliados.

Anexo II. Tabela exibindo a comparação da proteína Dns de *A. hydrophila* IBAer119 em relação a seus homólogos em outras espécies bacterianas.

Espécie	Identidade	Positividade	E value	Referência (NCBI)
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	100%	100%	0.0	-
<i>Aliivibrio longei</i>	58%	72%	6e-86	WP 023604093.1
<i>A. fisheri</i>	60%	72%	7e-88	WP 005417580.1
<i>A. salmonicida</i> ¹	58%	72%	6e-86	WP 012549359.1
<i>A. wadonis</i>	61%	72%	2e-88	ABB 72353.1
<i>Dickeya chrysanthemi</i> ²	59%	73%	1e-88	WP 027710818.1
<i>D. dadantii</i>	58%	71%	2e-88	WP 013311957.1
<i>D. dianthicola</i>	57%	71%	6e-88	WP 024107373.1
<i>D. solani</i>	58%	70%	1e-88	WP 022634966.1
<i>D. zeae</i>	58%	72%	3e-87	WP 012768269.1
<i>Erwinia amylovora</i>	58%	71%	2e-84	WP 004155466.1
<i>E. piriflorinigrans</i>	58%	71%	2e-84	WP 023653878.1
<i>E. pyrifoliae</i>	58%	71%	5e-84	WP 014539432.1
<i>E. tasmaniensis</i>	58%	71%	7e-84	WP 012442532.1
<i>E. toletana</i>	57%	70%	3e-77	WP 017803494.1
<i>E. tracheiphila</i>	56%	70%	3e-79	WP 016190286.1
<i>Escherichia coli</i>	62%	72%	2e-84	WP 000286508.1
<i>Oceanimonas smirnovii</i>	69%	81%	2e-113	WP 019934082.1
<i>Serratia fonticola</i>	62%	73%	3e-88	WP 024528353.1
<i>S. marcescens</i>	61%	72%	5e-88	KGY49168.1
<i>S. nematodiphila</i>	61%	73%	2e-87	WP 033632098.1
<i>S. odorífera</i>	60%	72%	2e-86	WP 004958770.1
<i>S. plymuthica</i>	61%	71%	2e-86	WP 004947990.1
<i>S. proteamaculans</i>	61%	73%	6e-88	WP 012146726.1
<i>Shewanella algae</i>	61%	73%	4e-98	WP 025008916.1
<i>S. amazonensis</i>	58%	72%	2e-86	WP 011758694.1
<i>S. báltica</i>	64%	72%	6e-95	WP 011847722.1
<i>S. decolorationis</i>	64%	74%	5e-97	WP 023266852.1
<i>S. Fidelis</i>	60%	74%	6e-93	WP 028765623.1
<i>S. frigidimarina</i>	61%	73%	2e-87	WP 011636032.1
<i>S. halifaxensis</i>	59%	70%	3e-87	WP 012275831.1
<i>S. haliotis</i>	61%	73%	1e-97	WP 025889744.1
<i>S. loihica</i>	61%	71%	2e-90	WP 011867019.1
<i>S. marina</i>	62%	77%	5e-103	WP 028521772.1
<i>S. oneidensis</i>	64%	74%	2e-97	WP 011071125.1
<i>S. piezotolerans</i>	60%	74%	2e-89	WP 020914451.1
<i>S. putrefaciens</i>	63%	74%	1e-96	WP 025007553.1
<i>S. sidiminis</i>	60%	72%	2e-88	WP 012144305.1
<i>S. violácea</i>	59%	73%	5e-89	WP 013052949.1
<i>S. xiamenensis</i>	64%	74%	4e-97	AFC95891
<i>S. waksmanii</i>	60%	73%	2e-89	WP 028772021.1
<i>S. woodyi</i>	61%	74%	1e-90	WP 012326718.1
<i>Vibrio albensis</i>	63%	76%	6e-94	WP 000972599.1
<i>V. alginolyticus</i>	63%	76%	7e-96	WP 005393967.1

continua

Espécie	Identidade	Positividade	E value	Referência (NCBI)
<i>V. anguillarum</i>	63%	76%	1e-94	WP 013857813.1
<i>V. azureus</i>	60%	75%	7e-92	WP 021711387.1
<i>V. breoganii</i>	57%	71%	9e-83	WP 026012709.1
<i>V. campbellii</i>	62%	75%	2e-93	WP 005534908.1
<i>V. cholerae</i>	64%	77%	2e-96	WP 032481929.1
<i>V. coralliilyticus</i>	63%	73%	4e-93	WP 031343391.1
<i>V. crassostreae</i>	58%	71%	3e-85	WP 017069588.1
<i>V. cyclitrophicus</i>	58%	71%	2e-85	WP 016785934.1
<i>V. diazotrophicus</i>	61%	73%	4e-92	ABB 72354.1
<i>V. fortis</i>	58%	72%	3e-86	WP 032549840.1
<i>V. furnissii</i>	62%	76%	3e-94	WP 004724253.1
<i>V. halioticoli</i>	56%	74%	3e-85	WP 023405078.1
<i>V. harveyi</i>	61%	75%	2e-93	WP 017189098.1
<i>V. ichthyenteri</i>	58%	72%	2e-85	WP 006713628.1
<i>V. kanaloae</i>	57%	70%	4e-84	WP 017056528.1
<i>V. lentus</i>	58%	71%	2e-85	ABB 72359.1
<i>V. maritimus</i>	61%	75%	5e-93	GAL 19365.1
<i>V. metschnikovii</i>	61%	75%	4e-93	WP 004396050.1
<i>V. mimicus</i>	63%	77%	2e-94	WP 000905552.1
<i>V. natriegens</i>	62%	77%	1e-94	WP 020333995.1
<i>V. navarrensis</i>	60%	75%	4e-90	KGK 09249.1
<i>V. nigripulchritudo</i>	59%	73%	1e-88	WP 022611621.1
<i>V. ordalii</i>	63%	76%	4e-95	WP 026028207.1
<i>V. owensii</i>	61%	75%	7e-93	WP 020197218.1
<i>V. ponticus</i>	58%	71%	3e-86	GAK 84708.1
<i>V. parahaemolyticus</i>	63%	76%	1e-95	WP 031816794.1
<i>V. proteolyticus</i>	60%	77%	6e-92	WP 021704390.1
<i>V. rotiferianus</i>	61%	75%	4e-93	WP 010450340.1
<i>V. shilonii</i>	59%	75%	9e-92	WP 006075170.1
<i>V. sinaloensis</i>	61%	74%	4e-92	KGY 08436.1
<i>V. splendidus</i>	58%	71%	1e-85	WP 017087221.1
<i>V. scophthalmi</i>	58%	72%	1e-85	WP 005593495.1
<i>V. tubiashii</i>	61%	75%	9e-93	KGY 11776.1
<i>V. variabilis</i>	61%	75%	6e-93	GAL 27926.1
<i>V. vulnificus</i>	61%	76%	3e-93	WP 017789838.1

¹Nova classificação, sinônimo de *Vibrio salmonicida* (Urbanczyk et al. 2007). ² Nova classificação, sinônimo de *Erwinia chrysanthemi* (NCBI).

Anexo III. Análise de alinhamento da sequência nucleotídica correspondente ao gene *aha3441* de *A. hydrophila* IBAer119 em relação aos seus homólogos em *Aeromonas*.

	10	20	30	40	50
<i>A. hydrophila</i> IBAer119		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP006883.1- <i>A. hydrophila</i> J-1		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC7966		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		ATGAAAGGAACACGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTTGCGCTCGC			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		ATGAAAGGTACTCGTACCCTGCTGTCGCTGGCCGTGGGGCTGGCACTTGC			
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****
	60	70	80	90	100
<i>A. hydrophila</i> IBAer119		CTCCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP006883.1- <i>A. hydrophila</i> J-1		CTCCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104		CTCCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		CTCCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		CTCCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC7966		CTCTCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGACC			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		GTCCCGTCTCTCCATGCCGCGGGCTTCAGTTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		GTCCCGTCCGTCCATGCCGCGGGCTTCAGTTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		ATCCCGTCCGTCCATGCCGCGGGCTTCAGTTGCCCGCCGACAGCGCCC			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		CTCTCCGTCCGTCTATGTCAGCCGGCTTCAGCTGCCCGCCGACAGCGACC			
Clustal Consensus	***	*****	*****	*****	*****
	110	120	130	140	150
<i>A. hydrophila</i> IBAer119		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP006883.1- <i>A. hydrophila</i> J-1		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC7966		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		---TTACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGTGACAAGAG---			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGCGACAAGAG---			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		---TACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCATTGGTGGCAAGAGT---			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		AACATACCCCCGATCCCGGTCATTACAGGGCAGCGGTCCGCCAGCGCGCTG			
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****
	160	170	180	190	200
<i>A. hydrophila</i> IBAer119		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGTGT			
CP006883.1- <i>A. hydrophila</i> J-1		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC7966		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP006579.1- <i>A. hydrophila</i> 4AK4		---CCCGCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP000644.1- <i>A. salmonicida</i> A449		---CCCCCTCATTCCTCGCC---GACAAGTTTCG---AAAGCCCCCAG---AGCGT			
CP002607.1- <i>A. veronii</i> B565		GCCACCCAGACCGTGACCGACAAGAACGGCAATGTGACCGGTAAATTCAG			
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****
	210	220	230	240	250
<i>A. hydrophila</i> IBAer119		CATGG-----TCAAGG---CAGTG---GTCTCTGGCCTTGCGAGAGCC			
CP006883.1- <i>A. hydrophila</i> J-1		CATGG-----TCAAGG---CAGTG---GTCTCTGGCCTTGCGAGAGCC			
CP007576.1- <i>A. hydrophila</i> pc104		CATGG-----TCAAGG---CAGTG---GTCTCTGGCCTTGCGAGAGCC			
CP007566.1- <i>A. hydrophila</i> AL09-71		CATGG-----TCAAGG---CAGTG---GTCTCTGGCCTTGCGAGAGCC			
CP005966.1- <i>A. hydrophila</i> ML09-119		CATGG-----TCAAGG---CAGTG---GTCTCTGGCCTTGCGAGAGCC			
CP000462.1- <i>A. hydrophila</i> ATCC7966		CATGG-----TCAAGG---CGGTG---GTCTCTGGTCTTGCGAGAGCC			
CP007518.1- <i>A. hydrophila</i> YL17		CATGG-----TCAAGG---CGGTG---GTCTCTGGTCTTGCGAGAGCC			

CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CTCGG-----TCAAGG---CGGTG--GTCTCCGCCCTCGGCGAGAGCC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CACGG-----TCAAGG---CGGTG--GTACGGCACTTGGTGAGAGTC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CACGGGCACCTTCAACGTTCCGGTATCGTGACGACGCTGGGCCAAAGACC
Clustal Consensus	* *
	260 270 280 290 300
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGCAGGGGAGACGGCAACCCCCAG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGCAGGGGAGACGGCAACCCCCAG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGCAGGGGAGACGGCAACCCCCAG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGCAGGGGAGACGGCAACCCCCAG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGCAGGGGAGACGGCAATCCCCAG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCTGGATGTGCAGGGGAGATGGCAACCCCCAG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	TGAACAGAGGCTTCTATCTGCAGGATCTGCAGGGGGATGGCAATCCCCAG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	TCAACAAAGGGTTCTACCTGCAGGATCTGCAGGGGGATGACCAATCCCCAG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	TGACCAAGGGGTTCTATCTGACCGACCCCGTGGGCGATGGCAATCCGGCC
Clustal Consensus	* *
	310 320 330 340 350
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	ACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCGTAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	ACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCGTAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	ACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCGTAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	ACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCGTAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	ACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCGTAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	ACCTCGGACGGCATCTTCGTCTTCCGTAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	ACCTCGGATGGCATCTTCGTCTACCTCAACGACAAGCAATTTGCGACCAA
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	ACGTGCGATGGCATCTTCGTCTACCTCAACGACAAGAACTTCGCCAGCAA
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	ACCTCTGATGGCATCTTGTCTATCTGTAACGACAAGGACTTCGCCAGCAA
Clustal Consensus	* *
	360 370 380 390 400
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GTACCCGGACATCCAGCCGGGTGCCGTGATCTGCCGAGGCAAGGTCG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GTACCCGGACATCAAGCCGGGTGCCGAAGTCTGCTGGAGGCAAGGTCG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	ATATAAGACGCTCAAAACCGGGGAGCAAGTCTGTCTGGAAGCACAGGTGC
Clustal Consensus	* *
	410 420 430 440 450
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	AGGAGTATTACAACCACACCCAGCTCAAGCCGGTGTGTTGACAGCGGTAC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	AGGAGTATTACAACCACACCCAGCTCAAGCCGGTGTGTTGACAGCGGTAC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	AGGAGTATTACAACCACACCCAGCTCAAGCCGGTGTGTTGACAGCGGTAC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	AGGAGTATTACAACCACACCCAGCTCAAGCCGGTGTGTTGACAGCGGTAC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	AGGAGTATTACAACCACACCCAGCTCAAGCCGGTGTGTTGACAGCGGTAC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	AGGAGTATTACGCCACACCCAGCTCAAGCCAAATGACTGACAAACGGCACC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	AGGAGTATCATGTTCAACCCAGCTCAAGCCCCGTGTTGACGGCAGCGCC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AGGAGTACTACAACCACACCCAGCTCAAGCCGGTGTGTTGACAGCGGTAC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AAGAATTTTACGGCGGCACCCAGCTGACCCCGTTAGTCGACAGGCCACC
Clustal Consensus	* *
	460 470 480 490 500
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	-----CCGCGCCTGCAGGTCTCGCCAGGGCTCGGTCCCGGCCGCCAT
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	-----CCGCGCCTGCAGGTCTCGCCAGGGCTCGGTCCCGGCCGCCAT
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	-----CCGCGCCTGCAGGTCTCGCCAGGGCTCGGTCCCGGCCGCCAT
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	-----CCGCGCCTGCAGGTCTCGCCAGGGCTCGGTCCCGGCCGCCAT
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	-----CCGCGCCTGCAGGTCTCGCCAGGGGGCTCGGTCCCGGCCGCCAT
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	-----CCGCGCCTGCAGGTGATCGCCCAAGGCACAGCCCCGGCCGCCAT
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	-----CCGCGCTGTCGGTCTCGCCAGGGCTCGGTCCCGGCCGCCAC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	-----CCGCGTCTGCAGGTCTCGCTCAGGGCTCTGTGCTGCGCGCT
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AAAAAAGCCCACTTGCAGTCAACCGCACAAAGGGCTGAATGTGCCGACGAG
Clustal Consensus	* *
	510 520 530 540 550
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CCCGCTGCGGGTGTGTTGAAAAACGAGACCCCTGGCCCGGGCGCTGGAGCGCC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CCCGCTGCGGGTGTGTTGAAAAACGAGACCCCTGGCCCGGGCGCTGGAGCGCC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CCCGCTGCGGGTGTGTTGAAAAACGAGACCCCTGGCCCGGGCGCTGGAGCGCC

CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CCCCGCTGCGGGTGCTGGAACCGAGACCCCTGGCCCGGGCGCTGGAGCGCC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CCCCGCTGCGGGTGCTGGAACCGAGACCCCTGGCCCGGGCGCTGGAGCGCC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CCCCGCTGCGGGTGCTGGAACCGAGACCCCTGGCCCGGGCGCTGGAGCGCC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GGCGCTGCGGGTGCTGGAGGGGGAACCCCTGGCCCGGGCACTGGAGCGTC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GCCGCTGCGGGTACTGGAACCGAGACCCCTGGCCAGGGCGCTGGAGCGTC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CGTATTGCGAGTCAATGAAGGGGAGACGCTTGCGCAAGCGCTCAATCGCC
Clustal Consensus	*** **
	560 570 580 590 600
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	ACGAAGGGATGCGGGTACGGCTCGATGCCGACAGCGCGCTCAAAATCAGC
Clustal Consensus	***** **
	610 620 630 640 650
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CGCAACTTCAGCTACGACTACGCCGCCGGCGCAACAACCTGGTGCTCTC
Clustal Consensus	***** **
	660 670 680 690 700
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGACGCCGACAGCA
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGACGCCGACAGCA
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGACGCCGACAGCA
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGACGCCGACAGCA
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGATGCCGACAGCA
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGACGCCGACAGCA
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CCACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCACGACGCCGACAGC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	ACACCAGGCGCCGCTGATGAAACCGACCCAGCTGCATGCCGCGGACAGCA
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CCACAAAACCCCGCTGATCAAAACCGACCCAACTTCATGTTGCCAACAGTG
Clustal Consensus	*** * *****
	710 720 730 740 750
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	AGGCTGCCAAGGCGCTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	AGGCCGCCAAGGCACTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	AGGCCGCCAAGGCACTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	AGGCCGCCAAGGCACTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	AGGCCGCCAAGGCGCTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	AGGCCGCCAAGGCGCTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CAGAAGCCGTGGCGCTGGCCAGGCCAACCGCGGCAACAGGCTGTTCCCTC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AGGAAGCCAAAGGCGCTGGCCAGGCCAATGCCCGCAACAGGCTATTCCCTC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CGGACCGCTGCGCACTAGCCACCAAAATGGCAGCAACCGTCTGGTAGTG
Clustal Consensus	* ** *****
	760 770 780 790 800
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GAATCGGACTTCAAGGCCGCCGACGGCAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GAATCGGACTTCAAGGCCGCCGACGGCAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GAATCGGACTTCAAGGCCGCCGACGGCAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GAATCGGACTTCAAGGCCGCCGACGGCAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GAATCGGACTTCAAGGCCGCCGACGGTAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GAATCGGACTTCAAGGCCGCCGACGGCAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GAGTCGGACTTCAAGGCCGCCAAGCGCAAGCTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GAGTCGACTTCAAGGCCGCCGATGGCAAACTGCCCTGGCTGCCGGCCTG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GAGTCGATTACAAAGCGCCGGATGGCGTACTGCCCTGGTTCCCGAGCTG
Clustal Consensus	** * * * * *****
	810 820 830 840 850
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GGAGCCTGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGAGCGCCCGGTCATCTGG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GGAGCCTGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGAGCGCCCGGTCATCTGG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GGAGCCTGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGAGCGCCCGGTCATCTGG

CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GGAGCCGGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGACGCCCCGGTCAATCTGG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GGAGCCGGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGACGCCCCGGTCAATCTGG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GGAGCCGGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGATGCCCCGGTCAACCTGG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GGAGCCGGAACAGGGTTACCTGCGCATCGGCGATGCCCCGGTCAATCTGG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GGAGCCGGAGCAGGGTTACCTGCGCATCGGCGATGCCCCGGTCAACCTGG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GGATCCGGAGCAGGGTTATCTGCGCATCGGCGATGCCCCGGTCAATCTGG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GGATCCGATCAGGGATATCTGCGCATCGGCGATCAACTAACCGGGCTGG
Clustal Consensus	*** *
	860 870 880 890 900
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GCGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGCTGATCGTGCCGCAG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	ACGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGCTGATCGTGCCGCAG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	ACGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGCTGATCGTGCCGCAG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	ACGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGCTGATCGTGCCGCAG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	ACGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGCTGATCGTGCCGCAG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	ACGCCATGGTGGGCTACAGCTACAACGAGTACCGGCTGATCGTGCCGCAG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	AAGCCCTGGTGGGTTACAGCTATGACGAGTACCGGCTGATAGTGCCCAAG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	ATGCGCTGGTGGGCTACAGCTACAACGAATACCGGTTGATGATGCCGCAG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AGGGGGTGCTCGTATACAACAAGGATGCGTTCCGCCCTGGTGGTACCGAGC
Clustal Consensus	* *
	910 920 930 940 950
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GATCAGGTGATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGACAACGACCG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GATCAGGTATATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGACAACGACCG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GATCAGGTATATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGACAACGACCG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GATCAGGTATATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGACAACGACCG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GATCAGGAGATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGACAACGACCG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GATCAGGTGATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGACAACGACCG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GATCAGCGCATCACC GCCGGGGGATCTGCTGCGCACCAGCGATGAGAACGACCG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GATCAGGTGATCACC GCCGGCGATCTGCTGCGCACCAGCGATTAACGATCG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GATGTCAACCTGACTGCCGGGCCCTGCTGCGCAACCTGAAGAGGATCG
Clustal Consensus	*** *
	960 970 980 990 1000
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CCAGAGCGCCCCGGGCCGTCGCGACGGCACCAGTCTGCGCGTCGGCAGCT
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CCAGAGCGCCCCGGGCCGTCGCGACGGCACCAGTCTGCGCGTCGGCAGCT
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CCAGAGCGCCCCGGGCCGTCGCGACGGCACCAGTCTGCGCGTCGGCAGCT
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CCAGAGCGCCCCGGGCCGTCGCGACGGCACCAGTCTGCGCGTCGGCAGCT
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CCAGAGCACCCCGGCCGTCGCGACGGCACCAGTCTGCGCGTCGGCAGCT
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CCAGAGCGCCCCGGGCCGTCGCGACGGCACCAGTCTGCGCGTCGGCAGCT
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CCAGGGCGCACCCGGGCCGCGCAATGGCACCAGACCTGCGCATCGGCAGCT
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CCAAAGCGCACCCGGGCCGTCGCGATGGCACCAGTTCGCGTATCGGCAGCT
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	TCAAGACGCGCCGGCTCGCCCTCGCTGGCAGCGATCTGCGGATCGGCAGCT
Clustal Consensus	** *
	1010 1020 1030 1040 1050
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGCGGTGCCCTC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGCGGTGCCCTC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGCGGTGCCCTC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGCGGTGCCCTC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGCGGTGCCCTC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGCGGTGCCCTC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	TCAACGTACTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCGTGGGGGGCGCCCTC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	TCAACGTGCTCAACTACTTTACCAGCCACTCCAGCGTGGGGGGGGCCCTC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	TCAACGTGCTCAACTACTTCAACAGCCACTCCAGCATCGGCGGCGCACTC
Clustal Consensus	***** *
	1060 1070 1080 1090 1100
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	AACGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	AACGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	AACGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	AACGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	AACGTACTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	AATGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	AATGTGCTCTGTGCGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AATGTGCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGCTGCAA
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AATATCCTGTGCAAGGATCAGGCGGATGCGGACAGCGCCAAGGGTTGCAA
Clustal Consensus	** *

227

CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	ATGGTGGCCATGATCTATCGCCCCGCGCTGCTACCCCCGAGCGGGGATGC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	ATGGTGGCCATGATCTACCGACCCGCAAGCTGACGCCGAGGGGGATGC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	ATGGTGGCGATGCTCTACCGTCTTGTCTGCTACCCCCGAGCGGATGC
Clustal Consensus	***** **
	1410 1420 1430 1440 1450
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CAACGTCATCACCTGCCGGTGCAGAAATACCTGGATGCCAAAGGGGTCG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CAACGTCATCACCTGCCGGTGCAGAAATACCTGGATGCCAAAGGGGTCG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CAACGTCATCACCTGCCGGTGCAGAAATACCTGGATGCCAAAGGGGTCG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CAACGTCATCACCTGCCGGTGCAGAAATACCTGGATGCCAAAGGGGTCG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CAACGTCATCACCTGCCGGTGCAGAAATACCTGGATGCCAAAGGGGTCG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CAACGTCATCACCTGCCGGTGCAGAAATACCTGGATGCCAAAGGGGTCG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CGAGGTATTCTGCTACCGGAGCAGCGCTACAT---CACGGGCGGCTCG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CAGCGTCATTACGCTGCCGGTACAGAAATACAGGATGCCAAAGGAGTCG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CAGCGTCATCAAGCTGCCGGAGCAGCGCTACAC---CACTGGTGGTGTAG
Clustal Consensus	* ** *
	1460 1470 1480 1490 1500
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	AGAAACAGGCCTCTCAGCGTGACTCCCTGGTGCAGACCTTCACCGTCGAG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	AGAAACAGGCCTCCAGCGTGATTCCCTGGTGCAGACCTTCACCGTCGAA
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	AGAAACAGGCCTCCAGCGTGATTCCCTGGTGCAGACCTTCACCGTCGAA
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	AGAAACAGGCCTCCAGCGTGATTCCCTGGTGCAGACCTTCACCGTCGAA
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	AGAAACAGGCCTCCAGCGTGACTCCCTGGTGCAGACCTTCACCGTCGAA
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	AGAAACAGGCCTCCAGCGTGACTCCCTGGTGCAGACCTTCACCGTCGAG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CCAGAGCGCAGGCCAGCGGGGATCCCTGGTGCAGCGCTTCGGGTCGCG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AGAAACAGGCCTCCAGCGTGACTCCCTGGTGCAGAGCTTCACCGTCGAG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CCAAGACAGCTGGTTCAGCGGATTCCTGGTTCAGACCTTCACCTCGCC
Clustal Consensus	* *
	1510 1520 1530 1540 1550
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GGCAGCAAGGATCCGCTGACCCCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGGG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AAGAGCAAGGAGCCGCTGACGCTGGTGGTCAACCACCTGAATCCAAAGG
Clustal Consensus	* *
	1560 1570 1580 1590 1600
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	TTCAGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CTCTGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CTCTGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CTCTGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	TTCAGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CTCAGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	ATCCGGCTGCTATGAGAACGGCGATGGCAAGACCGAGCCTGCGGATCTGC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	ATCCGGCTGCCTCGAGAACCCTGGACGGCAAG--GAGCCGGCCGATCTGC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GTCAGGCTGTACGAAAATGGCGATGGCAAGACAGAACCGGCGGACCTGC
Clustal Consensus	* *
	1610 1620 1630 1640 1650
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AGGGCAAGTGTACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTACTGGGCGAA
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AGGGCAAGTGCACCGAGTTCCGGGTTCAGTCCCGCCAAAGGTGCTGGGCGAG
Clustal Consensus	***** *
	1660 1670 1680 1690 1700
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GCGGTGAGCAAGCTGCCGGTTCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GCGGTGAGCAAGCTGCCGGTTCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GCGGTGAGCAAGCTGCCGGTTCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GCGGTGAGCAAGCTGCCGGTTCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GCGGTGAGCAAGCTGCCGGTTCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC

CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GCGGTGAGCAAGCTGCCGGCCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GCGGTGAACAAGCTGCCGGCCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GCGGTGAACAAGCTGCCGGCCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GCGGTGAGCAAACTGCCGGCCAGGTGCTGCTGGTGGGCGACTTCAACTC
Clustal Consensus	***** *
	1710 1720 1730 1740 1750
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CTACGCCCGGGAAGATGCCATCCGGGTGCTGACCGACTATGTGCCGACCG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CTACGCCAAGGAAGATCCGATCCGGGTCTTACCGACTACAAACCCGCCA
Clustal Consensus	***** *
	1760 1770 1780 1790 1800
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	ACGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	ACGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	ACGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	ACGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	ACGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	ACGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	AGGCGGATCGCCAGATCCGCTCCGCCCTCCACACCTTTATCGGCGAGCAA
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AAGGTCAGCGCAAGATTTCTCCGCCCTCCAGACCTTCCTCGGTCAGCAA
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CCAGCGAGCGGAAGATCTGATCCGCCCTCTCACACCTTTATCGGTCATCAC
Clustal Consensus	* *
	1810 1820 1830 1840 1850
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GTCTTTGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTACGGCTGCTGGTGA
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GTCTTTGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTACGGCTGCTGGTGA
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GTCTTTGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTACGGCTGCTGGTGA
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GTCTTTGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTACGGCTGCTGGTGA
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GTCTTTGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTACGGCTGCTGGTGA
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GTCTTTGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTACGGCTGCTGGTGA
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CCCTATGAGCAGATGGGTCCGCGCGTGGAGAGAACTACGGGCTGATCGA
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GTCTATGAGCAGACCGGCGAGCGAAGTGGCCAGAGCTATGGCTGATCGA
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	TCTATGAAACAGCTCGGTCCGGAAGTGACTCGCACTACGGCTGATCGA
Clustal Consensus	* *
	1860 1870 1880 1890 1900
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CATGAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CATGAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CATGAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CATGAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CATGAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CATGAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CATGAACGTCAGTTTCAACCAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	TATGAATGTCAGGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	TCTCAACGTCAGTTTCAACAAGGAGAAAGCCATCTCTACAGCTACGAGG
Clustal Consensus	* *
	1910 1920 1930 1940 1950
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CCGAGCTCGGCACCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGGC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CCGAGCTCGGCACCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGGC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CCGAGCTCGGCACCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGGC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CCGAGCTCGGCACCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGGC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CCGAGCTCGGCACCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGGC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CCGAGCTCGGCACCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGGC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CCGAGCTCGGCACCCCTGGATTACGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGAGC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CCGAACCTCGGTATCCCTGGACTATGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGAGC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GGGAGCTGGGCACCCCTGGACTACGCCCTCGCAACCCGGCGTGGCCGAGC
Clustal Consensus	* *
	1960 1970 1980 1990 2000
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	AAGGTGATCGCCGTGGCCGACTGGCACATCAACTCGTTTCGAGAGCAACCT
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	AAGGTGATCGCCGTGGCCGACTGGCACATCAACTCGTTTCGAGAGCAACCT
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	AAGGTGATCGCCGTGGCCGACTGGCACATCAACTCGTTTCGAGAGCAACCT
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	AAGGTGATCGCCGTGGCCGACTGGCACATCAACTCGTTTCGAGAGCAACCT

CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	AAGGTGATCGCGTGGCCGACTGGCACATCAACTCGTTCGAGAGCAACCT
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	AAGGTGATCGCGTGGCCGACTGGCACATCAACTCGTTCGAGAGCAACCT
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	AAGGTGGTGGCGGTAGCCGACTGGCACATCAACTCGTTCGAGAGCGACCT
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	AAGGTAGTTCGCGGTGCGCCGACTGGCACATCAATTCTGTCGAGAGCAGCCT
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AAGGTGGCAGGTGTCGCCGACTGGCACATCAACTCGTTCGAGAGCTCCCT
Clustal Consensus	***** * ** ***** ***** ** ***** **
	2010 2020 2030 2040 2050
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GTTTCGAGTACGGCCGGGACTTCACCGCGCATGATCAAGTCGGACAACC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GTTTCGAGTACGGCCGGGACTTCACCGCGCATGATCAAAATCGGACAACC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GTTTCGAGTACGGCCGGGACTTCACCGCGCATGATCAAAATCGGACAACC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GTTTCGAGTACGGCCGGGACTTCACCGCGCATGATCAAAATCGGACAACC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GTTTCGAGTACGGCCGGGACTTCACCGCGCATGATCAAGTCGGACAATC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GTTTCGAGTACGGCCGGGACTTCACCGCGCATGATCAAGTCGGACAATC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GTTTCGAATATGGCAGCGCCTTCACCGCGAGCTGATCAAGTCGGACAATC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GTTTCGAATATGGCCTGGCTTCACCGGTGATGATCAAGTCGACCAATC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	GTTTCGAATACGGCAGCCAGTACACCGGCTCCCTGCTCAAGTCTGACAACC
Clustal Consensus	***** ** ** * * ***** * ***** * ***** *
	2060 2070 2080 2090 2100
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAA
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAA
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAA
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAA
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAA
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAA
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CGTTTCAGCGCCTCCGACCCACGATCCATCATCGTCGACCTCAAGCTCAAC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CGTTTCAGCGCCTCCGATCATGACCCCATCATCGTCGACCTCAAGCTGAAG
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CCTTCAGTGCCCTCCGACCATGATCCATCATCGTCGACCTGAGCTGGAG
Clustal Consensus	* ***** ***** ** * * * * * ***** * * * *
	2110 2120 2130 2140 2150
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	GAGGAGAGCAACGGC-----GGTGGTGGTGGCATGGGCGC
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	GAGGAGAGCAACGGC-----GGTGGCGGAGCCATGGGCGC
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	GAGGAGAGCAACGGC-----GGTGGCGGAGCCATGGGCGC
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	GAGGAGAGCAACGGC-----GGTGGCGGAGCCATGGGCGC
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	GAGGAGAGCAACGGC-----GGTGGTGGTGGCATGGGCGC
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	GAGGAGAGCAACGGC-----GGTGGCGGCGCATGGGCGC
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GAGCAGAGCAAGGGC-----GGTGGCGGCGCATGGGAGC
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	GAAGAGAGCAACGGC-----GGTGGTGGTGGCATGAGCGC
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	AGCGATGCCACCAACCGGACTCCTCCTCAGGCGGCGGTGCACTGGGATT
Clustal Consensus	* ** ***** * * * * * * * *
	2160 2170 2180 2190 2200
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	CCTGTGCTGGCGCTGTGCGCTGGCCTGGCGTCTGCGCCACGGCTGA-
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	CCTGTGCTGGCGCTGTGCGCTGGCCTGGCGTCTGCGCCACGGCTGA-
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	CCTGTGCTGGCGCTGTGCGCTGGCCTGGCGTCTGCGCCACGGCTGA-
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	CCTGTGCTGGCGCTGTGCGCTGGCCTGGCGTCTGCGCCACGGCTGA-
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	TCTGTGCTGGCGCTGTGCGCTGGCCTGGCGTCTGCGCCACGGCTGA-
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	CCTGTGCTGGCCCTGCTGCCGCTGGCCTGGCGTCTGCGCCACGGCTGA-
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	CCTGTGCTGGCGCTGTGCCCCCTGGCCTGGCGCCCTCGGCACACCTTAT
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	CCTGTGCTGGCCCTGCTGCCCTGGCCTGGCGTCTGCGCCCAACTGA-
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	CGGCCCTGCTGGCCCTGTTGCCACTGGCCTGGCGACGTGCGCCGTTAA---
Clustal Consensus	***** ** * * * * * * * * * * * *
A. <i>hydrophila</i> IBAer119	..
CP006883.1-A. <i>hydrophila</i> J-1	--
CP007576.1-A. <i>hydrophila</i> pc104	--
CP007566.1-A. <i>hydrophila</i> AL09-71	--
CP005966.1-A. <i>hydrophila</i> ML09-119	--
CP000462.1-A. <i>hydrophila</i> ATCC7966	--
CP007518.1-A. <i>hydrophila</i> YL17	--
CP006579.1-A. <i>hydrophila</i> 4AK4	GA
CP000644.1-A. <i>salmonicida</i> A449	--
CP002607.1-A. <i>veronii</i> B565	--
Clustal Consensus	

* Indicam consenso no alinhamento entre todos os nucleotídeos avaliados. Grifado em amarelo base nucleotídica timina (T), aparentemente inexistente proveniente de um possível erro de sequenciamento.

Anexo IV. Tabela exibindo a comparação da proteína Aha3441 de *A. hydrophila* IBAer119 em relação a seus homólogos em outras espécies bacterianas.

Espécie	Identidade	Positividade	E value	Referência (NCBI)
<i>A. hydrophila</i> IBAer119	100%	100%	0.0	-
<i>Aliivibrio logei</i>	45%	61%	3e-180	WP 017022799.1
<i>A. salmonicida</i> ¹	45%	61%	1e-180	WP 044583425.1
<i>Enterovibrio calviensis</i>	48%	65%	0.0	WP 028025910.1
<i>E. novergicus</i>	48%	64%	0.0	WP 017002701.1
<i>Grimontia hollisae</i>	48%	68%	0.0	WP 005501346.1
<i>Photobacterium angustum</i>	45%	64%	0.0	WP 005371814.1
<i>P. danselae</i>	49%	68%	0.0	WP 005302670.1
<i>P. gaetbulicola</i>	51%	64%	0.0	WP 039464176.1
<i>P. halotolerans</i>	52%	68%	0.0	WP 027250643.1
<i>P. profundum</i>	48%	65%	0.0	WP 011217100.1
<i>Shewanella algae</i>	51%	65%	0.0	WP 044735111.1
<i>S. amazonensis</i>	53%	65%	0.0	WP 011761052.1
<i>S. baltica</i>	48%	62%	0.0	WP 012588430.1
<i>S. benthica</i>	45%	61%	0.0	WP 005496940.1
<i>S. decolorationis</i>	50%	64%	0.0	WP 023268388.1
<i>S. denitrificans</i>	49%	63%	0.0	WP 011497333.1
<i>S. frigidimarina</i>	49%	65%	0.0	WP 011639133.1
<i>S. haliotis</i>	50%	64%	0.0	WP 025889352.1
<i>S. loihica</i>	49%	65%	0.0	WP 011866989.1
<i>S. oneidensis</i>	48%	64%	0.0	WP 011071320.1
<i>S. putrefaciens</i>	48%	63%	0.0	WP 014611189.1
<i>S. sidiminis</i>	50%	67%	0.0	WP 041422367.1
<i>S. violacea</i>	46%	61%	0.0	WP 013052926.1
<i>S. xiamenensis</i>	49%	65%	0.0	WP 037414882.1
<i>S. woodyi</i>	49%	67%	0.0	WP 041417806.1
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	47%	62%	0.0	WP 039627369.1
<i>V. parahaemolyticus</i>	45%	60%	6e-179	WP 015297411.1
<i>V. sinaloensis</i>	46%	62%	0.0	WP 039484531.1
<i>V. splendidus</i>	47%	62%	0.0	WP 017095849.1

¹Nova classificação, sinônimo de *Vibrio salmonicida* (Urbanczyk et al. 2007).

WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	FGLTQIDIKADK---KFEVGAAGDVPAAAAFAVTEGESLEQALERFEGMK
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	YSNTQLASDAQS---YTKGTGS-TASLVTPLVLEEGESLRDALERYEGMQ
Clustal Consensus	: - *:: - - : : * - * *::**--**:
	360 370 380 390 400
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	VRLDADSALKISRNFSDYDAARRNNVLVLSHQAPLMKPTQLHDADSKAAKA
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	VKLTSHSLDRITRNFSDYDSKRNNMVLSHGAPLYKPTQLFAAESTETAIQ
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	VRLTQTSEMVVARNFDFDAFRNNMVLSEAPLFPKPTQLHIAGSQEAAD
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	VRLTRESDLVTRNFDFDAFRNNMVLSEAPNVKPTQLYMAGSGDAVA
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	VRLVADSQKLVTRNFDFDYSSYRNNMVLSHAAPLMKPTQLYVAGSEQAKA
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	VRLDAGSEMKSRTFSYDYAGRRNNMLSHKAPLMKPTQVYPALSEEAVA
Clustal Consensus	VELTAASDLFVTRNFSDYDSRRNNMLLSHEGPLFKPTQVHAADSDEAKA
	* * * : : *--*: - ***:*** - * ****:- * * *
	410 420 430 440 450
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	LAKANAGNRVFLSDFKAADGKLPWLPawePEQG-----YLRIGDAPV
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	LAKENAKRQITIESDNKAANGKVYPYFPEFASDIDQDGSADSYLRIGARIE
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	LVAANDANQLFIESDEKAPDGVVPYFPGLDAAEQG-----YIRVGDITVT
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	LAAANDANQLVIESDKAPDGVVPYFPGLDAAEQG-----YIRIGDITVT
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	LAAANVRNQLYIDTDAKAPDGVMPYFPALDAEQG-----YIRVGDITVV
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	LEKQNRGNELFVESDFKAADGVVPFLPDFAETG-----YIRVGDELK
Clustal Consensus	LAACKNAQNRIFLESDFKAASGQIPYYPDFAKDVQDGSSEHHIRLGSRVE
	* * - - : : * **--*: * : - : : * : *
	460 470 480 490 500
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	NLGAMVGYSYNEVRLVLPQDQVITAGDLLRTS-----DNDRQSAPA
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	GLEGVVAYSYGQYRLVASNT--ITQENITKALNTDGSSTLFNVERTDKPS
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	NLEGVLGYSFSDYRLVVTNE--LVASDFVR-----EQDRTAAPQ
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	NLEGVIGYSFHDYRLVATNA--LVASDFVR-----EQDRTAAPK
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	NLEGVIGYSYGEYRLPTNT--LSAADFIH-----HQDRTPAPQ
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	GLEGMVSYSYNEVRLVTTNT--ITPADIVR-----GMDRTDAPV
Clustal Consensus	GLHGVINYSYNEVRIATND--VTNTNFVTTGEG-----FDVARKAMPS
	- * - : : * : * : * : - : : : : * *
	510 520 530 540 550
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	RADGTDLRVGSFVNLNYFTSHSSVGGALNVLCKDQADADSAKGNRGAKN
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	IDDE-DLITTSFVNLNYFTSVSING-----DANPT-GQNRGATT
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	TFDETNLRVASFVNLNYFTSASAIGGDLNVTCDNQADADASRGNGRTKD
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	VFEGTNLRVASFVNLNYFTSASAIGGDLNVTCDNQADADASNGNRGAKD
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	AVPDTQLRVASFVNLNFTSDSDIGGALNAMCKDQADADAAASGNRGAKT
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	VAEKGDIRVASFVNLNFFNDV-VGG-----DANPT-GSNRGALT
Clustal Consensus	IKES-DLRVASFVNLNYFTSHSSVGGPLNVSCSDQADADASRGNGRAKE
	: : * ****:*-- * **:- * ****:
	560 570 580 590 600
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	LEDFQKQRAKIVNAITEMDADLLGLMEIENNGFDSHSAISDLVQALNAQF
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	ADEFAIQQAQKILSALTAIDADIIGLMEIENNGFGNSAIHDLTAVLNAQF
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	AAEFALQQAQKIVNALTAMDAIDIVGLMEIENNGFADTGALANLVELLSRF
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	AAEFALQQAQKIVNALTAMDAIDIVGLMEIENNGFGDNGALANLVAELNAQF
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	LSDFQLQSKIVNALTAMNADIVGIMEIENNGFDDDSALANLVTLNQFQF
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	EEEMLLQRTKIVNAITAMNADIVGLMEIANNNGFGEKSAIQNLDDALNAEQ
Clustal Consensus	LDEFLLQQAQKIVNAMVKMDADIIGLMEIENNGFGDGSALQDLVDALEAM
	: : * : * : * : * - : : * : * : * : * : * * - - * : * * -
	610 620 630 640 650
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	KEAGKQYAPVTLPKALLQGEHYFGGDAIMVAMIYRPAKLAPQGDANVITL
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	EDKEDHYKYVEIDAADKYQGEYLGSDAIMVALLYRPAKVRLEGDARVIKT
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	ADEADHYAYVTPATADLTGAFLGGDAIQVALIYRPAVAPSSDAVVVRM
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	ADSADHYAYVIPAEADLTGAFLGGDAIQVALIYRPARVELKGDARVIRM
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	SDPADHYSFITIEQADMHQGRFLGSDAITVALIYRPGKVPASAAQVIRM
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	S-ADNAYSFVEIAEADKTDGKYFGNDAITVGMLYRAAKVSPGTAFFVIET
Clustal Consensus	DDTSDDHYSFVELDDKDKVQGEFFGTDAIMVAILYRANEVTPNGDAKVIIVT
	- * * : : * * * * - : : * * * - - * * :
	660 670 680 690 700
<i>A. hydrophila</i> _IBAer119	
WP_017022799.1- <i>A. logei</i>	PVQKYLDAGK-----VEKQAS-----QRDSLVTFTTVEGS--KDPLTLV
WP_028025910.1- <i>E. calviensis</i>	PEQHVNTANTVTRDNNGTIESNPAYDKYQRHSLVQEFIVKEA--KEPLTVV
WP_005501346.1- <i>G. hollisiae</i>	PEQHISGADP-----SGEERQLDKFQRDSLQTFDFVV---EGEMLSV
WP_027250643.1- <i>P. halotolerans</i>	PEQHISGENP-----QGEIRQLDKFQRDSLQTFSLN---HGETLSVA
WP_011761052.1- <i>S. amazonensis</i>	PEQHLSGVNP-----QGETKQLDKYQRDSLQTFFAVQGAADAPLTVV
WP_039627369.1- <i>V. ichthyocentri</i>	PEQHAPEGVASRDNKGTVETSPAQDKYQRHSLGQTFKVKD---ENLTVV
Clustal Consensus	PEQHIADKTITRKDG--AEGNPAYDKYQRHSLQTFKVKES--GDDLSTIV
	* * : : * * * * * : : : : * : * : -

Peptídeos sinais localizados na região N-terminal estão representados em azul claro. Domínios conservados LTD (*Lamin Tail Domain*) em cinza. Domínios conservados YhcR-OBF-like, em rosa. Domínios conservados EEP (*Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase*), em vermelho. Letras em coloração branca representam genéricas superfícies de ligação I e II. Resíduos de cisteína estão

representados na cor verde. Em amarelo estão representados os possíveis sítios catalíticos. Quadrantes tracejados indicam os possíveis sítios de ligação a metal (Mg). Quadrantes sólidos indicam possíveis sítios de ligação a fosfatos. O aminoácido Asparagina (D) localizado na posição 891 do alinhamento, compartilham os mesmos sítios para ligação a metal, sítio catalítico e para ligação a fosfato.