

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ESTUDO DO TRANSPORTE DE OLIGOPEPTÍDEOS EM *Aeromonas hydrophila* E COMPARAÇÃO COM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO

**Fernanda Cattani**

Caxias do Sul

2008

**FERNANDA CATTANI**

ESTUDO DO TRANSPORTE DE OLIGOPEPTÍDEOS EM *Aeromonas hydrophila* E COMPARAÇÃO COM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

Caxias do Sul

2008

*Aeromonas...*

Sou discreta, mas difícil.

Gosto do frio e calor.

Nos peixes posso morar.

E no homem dor causar.

Dália dos Prazeres Rodrigues e  
Roseli Vigió Ribeiro

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus pais, Analice e Antonio, companheiros de sempre em todos os sentidos, sempre o meu porto de abrigo, e que são, os dois, a minha fonte de motivação.

É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes, em casa me esconder,  
que em conformidade viver.

(Martin Luther King).

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ana Paula Longaray Delamare, pela sua orientação, oportunidade e disponibilidade para a realização desse trabalho; pela compreensão, conhecimentos transmitidos e estímulo para a superação das dificuldades.

À Professora Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Sergio Echeverrigaray, pelo seu conhecimento, dedicação e disponibilidade em nos ajudar sempre.

Aos Professores Dr. Diego Bonatto e Dr. Günther Johannes Lewczuck Gerharrdt pela colaboração na realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório, pela amizade e apoio prestados durante todo este período; e bate papos durante o intervalo para o café.

À Manuela Figueiro por sua amizade, e pela indispensável ajuda e interessantes sugestões durante os experimentos.

À Luciana Bavaresco Andrade Touguinha, por todo carinho e apoio, sobretudo pelo incentivo nos momentos difíceis, e amizade sincera que conquistamos neste período.

Ao Jucimar Zacaria por sua gentileza, amizade, e a imensurável ajuda.

Aos docentes e funcionários do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo exemplo e incentivo de sempre.

Aos pós-graduandos do PPGBIO Manuela, Queli, Nadine, Fernanda Barea, Gustavo, Fransôe e Cassiano pela boa convivência e ajuda constante.

Aos meus familiares agradeço pelo apoio e compreensão pelas minhas horas de ausência.

Às minhas amigas Paula, Débora, Janaína, Marina, Vanessa, Juliane e Viviane. É impossível expressar em palavras a minha gratidão por nossa amizade que me é fundamental.

Ao Augusto, pela compreensão e carinho, sempre me apoiando em todos os sentidos.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todas as outras pessoas que embora não nomeadas, me brindaram com seu inestimável apoio, paciência, tolerância e afeto em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

## ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b><u>LISTA DE TABELAS.</u></b>   | <b>ix</b>  |
| <b><u>LISTA DE QUADROS.</u></b>   | <b>x</b>   |
| <b><u>RESUMO..</u></b>  | <b>xiv</b> |
| <b><u>ABSTRACT..</u></b>  | <b>xv</b>  |
| <b><u>1. INTRODUÇÃO..</u></b>   | <b>16</b>  |
| <b><u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..</u></b>  | <b>18</b>  |
| <u>2.1 O gênero <i>Aeromonas</i>.</u>   | 18         |
| <u>2.1.1 Distribuição e ocorrência das bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>.</u>  | 20         |
| <u>2.1.2 Aspectos clínicos associados a bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>.</u>                                       | 25         |
| <u>2.1.3 Fatores de virulência e resistência a antibióticos em <i>Aeromonas</i>.</u>                                    | 27         |
| <u>2.2 Sistemas de transporte.</u>  | 31         |
| <u>2.2.1 Transportadores do Tipo ABC..</u>  | 32         |
| <u>2.2.2 Sistemas de transporte de oligopeptídeos – Sistema Opp.</u>  | 39         |
| <b><u>3. MATERIAL E MÉTODOS.</u></b>  | <b>48</b>  |
| <u>3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo.</u>  | 48         |
| <u>3.2 Análises Computacionais – Bioinformática.</u>  | 49         |
| <u>3.2.1 Análise computacional para identificação dos componentes do sistema de transporte de oligopeptídeos - Opp.</u> | 49         |
| <u>3.3 Avaliação da presença do gene <i>oppA</i> em distintas espécies de <i>Aeromonas</i> spp.</u>                     | 51         |
| <u>3.3.1 <i>Primers</i> Utilizados.</u>   | 51         |
| <u>3.3.2 Amplificação do gene <i>oppA</i>..</u>   | 51         |
| <u>3.3.2.1 Separação e visualização dos segmentos amplificados.</u>   | 52         |
| <u>3.4 Extração de Proteínas Periplasmáticas.</u>   | 53         |

|  |           |
|--|-----------|
| <u>3.5 SDS-PAGE e imunodeteccção.</u>  | 53        |
| <u>3.6 Seqüenciamento do gene <i>oppA</i> de <i>Aeromonas</i>.</u>   | 55        |
| <u>3.6.1 Purificação do produto de PCR.</u>  | 55        |
| <u>3.6.2 Preparação da reacção de seqüenciamento.</u>  | 56        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.</b>  | <b>57</b> |
| <u>4.1 Análises Computacionais - bioinformática.</u>   | 58        |
| <u>4.1.1 Análise comparativa das seqüências e organização genética do operon <i>opp</i> em <i>A. hydrophila</i> e <i>A. salmonicida</i>, e outras espécies de bactérias Gram-negativas.</u>  | 58        |
| <u>4.1.2 Caracterização do operon <i>opp</i> de <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966.</u>  | 63        |
| <u>4.1.3 Análises das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA identificadas em <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 e <i>A. salmonicida</i> A449 e de diferentes bactérias Gram-negativas.</u> | 65        |
| <u>4.1.4 Alinhamento das seqüências protéicas da OppA de <i>A. hydrophila</i> e <i>A. salmonicida</i></u>  | 68        |
| <u>4.1.5 Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA de <i>Aeromonas</i> e de diferentes bactérias Gram-negativas.</u>  | 69        |
| <u>4.1.6 Análise estrutural “in silico” da OppA de <i>A. hydrophila</i> ATCC7966.</u>  | 72        |
| <u>4.2 Extração de proteínas periplasmáticas e deteccção da proteína OppA em amostras de <i>Aeromonas</i> spp.</u>   | 76        |
| <u>4.3 Avaliação da presença do gene <i>oppA</i> em distintas espécies de <i>Aeromonas</i>.</u>  | 79        |
| <u>4.3.1 Amplificação do gene <i>oppA</i>.</u>   | 79        |
| <u>4.4 Seqüência do gene <i>oppA</i> e da proteína OppA em <i>A. hydrophila</i>, <i>A. sobria</i> e <i>A. caviae</i>.</u>  | 83        |
| <b>5. CONCLUSÕES.</b>  | 96        |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>  | 98        |



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Descrição das linhagens de *Aeromonas* spp.: denominação, nome científico e origem.....48
- Tabela 2.** Sequência de *primers* utilizados para a avaliação do gene *oppA* em *Aeromonas*.  
..... 51
- Tabela 3.** Descrição dos aminoácidos das proteínas OppA de *Aeromonas hydrophila* e *A. salmonicida* e de diferentes bactérias Gram-negativas..... 67

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Genes associados ao transporte de peptídeos em *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e *Aeromonas salmonicida* A449..... 62
- Quadro 2.** Aminoácidos (aa), massas moleculares (kDa), valores de identidade (%)/similariedade (%) previstos entre os ortólogos protéicos do operon *opp* de diferentes bactérias Gram-negativas em relação as proteínas identificadas na linhagem de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966..... 64
- Quadro 3.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína OppA de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449..... 68
- Quadro 4.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA de diferentes bactérias Gram-negativas, comparadas com a seqüências de *A. hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A449..... 70
- Quadro 5.** Alinhamento das seqüências nucleotídicas *oppA* das linhagens *A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002), *A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001) e *A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008) e *A. salmonicida* A449..... 85
- Quadro 6.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína OppA de *A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002), *A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001) e *A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008) e *A. salmonicida* A449<sup>#</sup>..... 89
- Quadro 7.** Alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *oppA*, correspondente a região central do gene (posição 398 a 805) de diferentes espécies de *Aeromonas*\* seqüenciadas e a mesma região correspondente da espécie *A. salmonicida* A449<sup>#</sup>..... 91

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática de um típico transportador do tipo ABC em membrana celular. O domínio transmembrana forma o poro através da membrana citoplasmática e juntamente com o domínio de ligação nucleotídica associado, o qual é encontrado na face citosólica da membrana. (Figura adaptada de Burke & Ardehal, 2007)..... 35
- Figura 2.** Modelo do mecanismo de translocação do transportador ABC, proteína de ligação ao substrato-dependente. (Figura adaptada de Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).....37
- Figura 3.** Transportador ABC de *Salmonella typhimuirum* LT2. Figura disponível (online) <http://www.genome.ad.jp.keeg/pathway> (12/02/2008)..... 41
- Figura 4.** Organização genômica do sistema de transporte de oligopéptidos de *Aeromonas*. (A) *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (B) *Aeromonas salmonicida* A449... 59
- Figura 5.** Organização genética dos operons *opp* de diferentes bactérias Gram-negativas, a partir dos genomas disponíveis no NCBI..... 60
- Figura 6.** Modelo estrutural da proteína OppA de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, mostrando os três domínios típicos..... 74
- Figura 7.** SDS-PAGE proteínas periplasmáticas em amostras de *Aeromonas*..... 77
- Figura 8.** Imunodeteção da proteína OppA em amostras de *Aeromonas*..... 78

- Figura 9.** Amplificações do gene *oppA* em distintas espécies de *Aeromonas* pela PCR. (A) Primers OppA-5 (765 pb); (B) Primers OppA-6 (542 pb); (C) Primers OppA-7 (712 pb); (D) Primers OppA-8 (400 pb)..... 80
- Figura 10.** Amplificações do gene *oppA* em distintas espécies de *Aeromonas* pela PCR. (A) Primers OppA-5F/OppA-7R (1257 pb); (B) Primers OppA-5F/OppA-8R (1526 pb); (C) Primers OppA-6F/OppA7R (1034 pb); (D) Primers OppA-6F/OppA-8R (1303 pb)..... 82
- Figura 11.** Cromatograma do seqüenciamento da amostra IBAer 002 (*A. hydrophila* ATCC 7966)..... 84
- Figura 12.** Dendrograma baseado no alinhamento de seqüência nucleotídica do gene *oppA*. O Dendrograma foi calculado utilizando algoritmo Neighbor-joining e bootstrap (100 replicas). Distâncias “Maximum Composite Likelihood”..... 88
- Figura 13.** Dendrograma baseado no alinhamento de seqüência proteica OppA. O Dendrograma foi calculado utilizando algoritmo Neighbor-joining e bootstrap (100 replicas). Distâncias “Maximum Composite Likelihood”..... 90
- Figura 14.** Dendrograma baseado no alinhamento de uma seqüência de 406 pb (aprox. posições 398 a 805 do gene *oppA* da seqüência de *A. hydrophila* ATCC7966-Aer002). O Dendrograma foi calculado utilizando algoritmo Neighbor-joining e bootstrap (100 replicas). Distâncias “número de diferenças”.....94

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABC – ATP Binding Cassette

ATCC – American Type Culture Collection

CCT – Coleção de Culturas Tropical

CECT – Colección Española de Cultivos Tipo

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético sal sódico

NBDs – Nucleotide-binding domains

NCBI – National Center of Biotechnology Information

NCIB – National Collection of Industrial Bacterial

Opp – Sistema de transporte de Oligopeptídeos

SBP – Substrate Binding Protein

SDS – duodecilsulfato de sódio

TMDs – transmembrane domains

UFC/g – unidades formadoras de colônia por grama

UFC/ml – unidades formadoras de colônia por mililitro

## RESUMO

O sistema de transporte de oligopeptídios (sistema opp) está envolvido em diferentes aspectos da fisiologia bacteriana, incluindo nutrição, comunicação intercelular e fatores associados com a virulência. Estes transportadores ABC são formados por uma proteína de ligação a oligopeptídios, uma permease e um domínio de ligação ao ATP. As *Aeromonas* são bactérias Gram-negativas aquáticas ubíquas associadas com várias doenças em humanos, especialmente, gastroenterites. Atualmente, *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* são consideradas como patógenos emergentes pela OMS. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o sistema de transporte de oligopeptídios em *Aeromonas* utilizando para tanto diversas ferramentas bioinformáticas e moleculares. Os resultados mostraram que, assim como em outras bactérias Gram-negativas, os genes *opp* de *Aeromonas* encontram-se organizados em um único operon policistrônico formado por cinco genes (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*). O gene *oppA* e a proteína periplásmica de ligação a oligopeptídios correspondente (OppA) são altamente conservados, mesmo entre bactérias de famílias distintas. O modelo da proteína OppA de *A. hydrophila* mostrou a estrutura típica “Venus flytrap”, semelhante ao modelo de *S. typhimurium*. Além disso, a presença do gene *oppA* foi confirmada em todas as linhagens avaliadas. A OppA de várias espécies de *Aeromonas* foram reconhecidas por anticorpos obtidos contra a OppA de *E. coli*, confirmando a similaridade entre estas proteínas, e a expressão da OppA em *Aeromonas*. O seqüenciamento completo ou parcial do gene *oppA* de diferentes espécies de *Aeromonas* permitiu confirmar a elevada conservação do mesmo, e corroborar dados filogenéticos prévios.

**Palavras-chave:** *Aeromonas*; Sistema Opp; Proteína de ligação ao oligopeptídeo – OppA.

## ABSTRACT

The oligopeptide transport system (Opp system) is involved in different aspects of bacterial physiology, including nutrition, intercellular communication, and factors associated with virulence. These ABC transporters are formed by an oligopeptide binding protein, a permease, and ATP-binding domain. *Aeromonas* are ubiquitous aquatic Gram-negative bacteria associated with several human diseases, particularly gastrointestinal disorders. Now a day, *A. hydrophila*, *A. sobria* and *A. caviae* are considered as emerging pathogens by the WHO. In this context, the objective of the present study was to characterize the oligopeptide transport system of *Aeromonas* using several bioinformatic and molecular tools. The results showed that as in other Gram-negative bacteria, the *opp* genes of *Aeromonas* are organized in a single polycistronic operon formed by five genes (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* and *oppF*). The *oppA* gene and its corresponding periplasmic oligopeptide-binding protein (OppA) are highly conserved, even between different bacterial families. *A. hydrophila* OppA model exhibits a typical Venus flytrap structure, similar to the *S. typhimurium* model. Furthermore, the presence of the *oppA* gene was confirmed in all the *Aeromonas* strains evaluated. The OppA of several *Aeromonas* species were recognized by antibodies obtained against *E. coli* OppA, confirming the similarity between these proteins, and the expression of the oligopeptide binding protein in *Aeromonas*. The complete or partial sequencing of the gene *oppA* of different species of *Aeromonas* allowed confirming the high conservation of this gene, and corroborate previous phylogenetic data.

**Key-words:** *Aeromonas*; Opp system; Oligopeptide-binding protein – OppA

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, surtos de doenças bacterianas de origem alimentar têm sido reportados por todo mundo, alguns causados por agentes denominados de clássicos, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp, mas a grande maioria ocasionada por bactérias emergentes, entre as quais *Aeromonas* spp.

As bactérias do gênero *Aeromonas* são bacilos Gram-negativos, oxidase positivas, anaeróbicos facultativos, e representantes da família Aeromonadaceae. Encontram-se amplamente distribuídos no ambiente aquático e são reconhecidos por produzir doença em diferentes espécies animais. Atualmente, o interesse nesse patógeno, responsável por gastroenterites, bacteremia, e septicemia no homem, vem aumentando significativamente, uma vez que sua presença nas diferentes fontes de água e alimentos para o consumo humano pode representar um risco à saúde.

Sistemas de transporte são essenciais para o trânsito de substâncias através do envoltório celular bacteriano, em especial nutrientes importantes para o crescimento e ao metabolismo celular. Entre os sistemas de transporte dependentes de energia destacam-se aqueles que dependem da clivagem de ATP, conhecidos como transportadores do tipo ABC (*ATP Binding Cassete*), que são proteínas transmembrans que transportam diversas



substâncias através da membrana citoplasmática. Estes sistemas são responsáveis pela captação de nutrientes como oligopeptídios, poliaminas, açúcares, aminoácidos, nitrato, íons, ferro, molibdato e outros, assim como excreção de substâncias tóxicas e outros componentes celulares.

Transportadores ABC são muito difundidos entre os organismos vivos e compreendem uma das maiores famílias protéicas. Por exemplo, componentes dos transportadores ABC são expressos por aproximadamente 5% do genoma de *Escherichia coli*.

Dentre os sistemas do tipo ABC, destaca-se o sistema de transporte de oligopeptídeos (Opp), responsável pela captação de cadeias peptídicas de três ou mais resíduos de aminoácidos. Além deste papel na nutrição bacteriana, o sistema Opp regula importantes processos celulares afetando tanto a fisiologia como fatores associados à virulência, incluindo comunicação intercelular, desenvolvimento de competência e esporulação, síntese de parede celular, e adesão à célula hospedeira, dessa forma, influenciando a sobrevivência e patogenicidade bacteriana em várias espécies.

Até o momento não existem referências a estudos diretos ou indiretos envolvendo o transporte de oligopeptídios em *Aeromonas*. Entretanto, uma análise preliminar no genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 (loci 2911908-2906268), disponibilizado no GeneBank em 08/11/2006 e *Aeromonas salmonicida* A449 (loci 1787488-1781793), disponibilizado no GeneBank em 17/04/2007, permitiu identificar nestas posições seqüências com alta homologia com os genes *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF* de outras bactérias Gram-negativas.

Neste sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar e caracterizar o sistema de transporte de oligopeptídios em *Aeromonas* spp., uma vez que não dispomos de dados a respeito deste agente. Desta forma, contribuir de forma significativa para o conhecimento mais aprofundado da fisiologia e patogenicidade das *Aeromonas* spp.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Nos anos recentes, surtos de doenças bacterianas de origem alimentar têm sido reportados por todo mundo, alguns causados por agentes chamados clássicos, os quais têm patogenia e epidemiologia bem conhecidas, como o *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., mas a grande maioria determinada por bactérias que não são comumente pesquisadas durante investigações de surtos. Dentre essas bactérias estão as *Aeromonas* spp. (Carneiro & Rossi Júnior, 2006). Esses organismos são considerados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Environmental Protection Agency (EPA – Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana) como patógenos emergentes.

### **2.1 O gênero *Aeromonas***

O gênero *Aeromonas* é formado por bacilos Gram-negativos em forma de vírgula, retos com extremidades arredondadas, ou células que se aproximam da forma esférica. As *Aeromonas* podem se apresentar isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, sendo geralmente

monotríquias, embora flagelos peritríquios possam ser formados em culturas jovens em meio sólido (Carnahan & Altwegg, 1996; Koneman *et al.*, 2001). São microrganismos psicrófilos e mesófilos, anaeróbicos facultativos, produtores das enzimas catalase e oxidase, fermentadores de glicose e de outros carboidratos, reduzem nitrato a nitrito, e geralmente são móveis pela presença de flagelos polares; são resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato) (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005). E, em sua maioria, produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinase (Popoff & Lallier, 1984; Carnahan & Altwegg, 1996; Altwegg, 1999; Koneman *et al.*, 2001; Abbott, 2003; Bernardes *et al.*, 2003; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005).

Dentre as características do gênero, *Aeromonas* crescem em uma ampla escala de condições ambientais: valores de pH entre 4,0 a 10,0, concentrações salinas de até 6,5%, temperatura de crescimento entre 4°C a 42°C, sendo entre 28 a 30°C, a temperatura ótima de crescimento (Delamare *et al.*, 2000; Zucolotto *et al.*, 2006). Alguns estudos demonstram que as bactérias do gênero *Aeromonas* a 5°C são capazes de quadruplicar sua população em curto espaço de tempo, indicando assim, a possibilidade de crescimento psicrotrófico competitivo em grande variedade de alimentos (Palumbo *et al.*, 1989; Kirov *et al.*, 1993a; Kirov *et al.*, 1993b). É importante ressaltar que cepas de *Aeromonas hydrophila* mantidas sob temperatura de refrigeração (5°C), comumente utilizada no armazenamento e conservação de alimentos perecíveis são capazes de produzir enterotoxinas e hemolisinas (Majeed *et al.*, 1990).

Devido às semelhanças fenotípicas entre as espécies de *Aeromonas*, e ainda devido à diversidade desses organismos, sua identificação ao nível de espécies pode representar um processo exaustivo e complicado. Por essa razão, pesquisadores estão associando métodos moleculares às técnicas bioquímicas (Borrel *et al.*, 1997; Janda & Abbott, 1998).

O gênero aqui estudado pertence à família Aeromonadaceae, e de acordo com a última edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology o gênero compreende as seguintes espécies: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarium*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* (biovars *sobria* e *veronii*), *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, (Martin-Carnahan & Joseph, 2005) e três novas espécies, *Aeromonas culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002), *Aeromonas simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004) e *Aeromonas molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004), têm sido recentemente descritas.

Em humanos, *Aeromonas* spp são responsáveis por gastroenterites, diarreia crônica, infecções em feridas, infecções do trato respiratório, peritonites, infecções do trato urinário e septicemia. Entre as *Aeromonas* associadas a infecções em humanos *A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. veronii* biovar *sobria* são as espécies clinicamente importante. Algumas espécies estão associadas com uma ampla variedade de doenças em animais de sangue quente e frio, incluindo peixes, anfíbios, répteis, pássaros e gado. *Aeromonas veronii*, *A. hydrophila* e *A. salmonicida* são capazes de causar septicemia em peixes de água doce e salgada. Isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* secretam muitos produtos extracelular, como hemolisinas, enterotoxinas e proteases (Szczuka & Kaznowski, 2004; Canals *et al.*, 2007).

### **2.1.1 Distribuição e ocorrência das bactérias do gênero *Aeromonas***

As *Aeromonas* spp. são microrganismos que possuem uma ampla distribuição em vários tipos de ambientes hídricos, podendo ser encontradas em água doce, salgada e salobra, com relatos de isolamento a partir de água utilizada para os mais diversos fins. Estes podem

ou não ser poluídos, receber ou não tratamento de desinfecção pelo cloro, apresentar ou não contaminação por fezes, dispor de matéria orgânica e conter material oriundo do solo (Kirov *et al.*, 1993b; Carneiro & Júnior, 2006). A água por sua vez, exerce papel de extrema importância como fonte de contaminação dos alimentos de origem animal e vegetal (Hänninen & Sitonen, 1995; Rossi Júnior *et al.*, 2000).

Esta grande distribuição deve-se à sua alta capacidade de multiplicação independentemente de haver algum hospedeiro humano ou animal, bem como à facilidade de sobrevivência em diversificados ambientes. Condições adequadas de pH, temperatura e nutrientes favorecem a multiplicação destas bactérias em ambientes aquáticos (Rocha, 2004).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são ubíquas em ambientes aquáticos sendo facilmente isoladas em águas doces ou marinhas em praticamente todas as latitudes (Handfield *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1996; Janda & Abbott, 1998; Chacón *et al.*, 2003; Huddleston *et al.*, 2006). Em rios limpos ou no mar as contagens variam entre  $10^0$  e  $10^2$  UFC/ml, podendo chegar a número acima de  $10^8$  UFC/ml em esgotos, o que indica que níveis elevados de matéria orgânica na água favorecem o desenvolvimento destas bactérias. Em águas potáveis as contagens são da ordem de  $10^1$  a  $10^3$  UFC/ml (Holmes *et al.*, 1996). Existe uma grande preocupação sobre a prevalência de *A. hydrophila* especialmente na água de consumo, pois esta é considerada a espécie mais patogênica para o homem (Costa *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2006).

Estudos sobre a epidemiologia das gastroenterites vinculadas à presença de *Aeromonas* spp, têm estabelecido a água como principal veículo de transmissão (Neves *et al.*, 1990; Kirov, 1993a; Hänninen & Sitonen, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Bulhões e Rossi Júnior, 2002). Neste sentido, Fuzihara *et al.* (1995) verificaram 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, 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* em 34% das amostras analisadas, coliformes totais em 23% e *E. coli* em 11%. Das *Aeromonas* isoladas 9,9% eram provenientes da captação, 51,7% do armazenamento e em 33% do sistema de distribuição.

Espécies do gênero *Aeromonas* também têm sido freqüentemente encontradas em águas utilizadas para diferentes fins. Isoladas em indústria de alimentos, em águas de abastecimento público, água engarrafada, água clorada, poluídas, de riachos e rios, e em diferentes fontes de água utilizadas na irrigação agrícola, e em águas utilizadas para lavagens de alimentos (Janda & Abbott, 1998; Huddleston *et al.*, 2006; Seshadri *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2007). Neste sentido, Araújo *et al.* (1989) e Neves *et al.* (1990) observaram correlação, particularmente em águas poluídas, entre presença de *Aeromonas* spp. e de microrganismos do grupo dos coliformes, normalmente utilizados como indicadores da qualidade higiênico-sanitária da água. Em águas livres de poluição foi verificada a presença de *Aeromonas* e não de coliformes, o que de acordo com Abeyta Júnior *et al.* (1990) pode caracterizar a origem não fecal das *Aeromonas* spp. ou a sua capacidade de crescimento e competição em ambientes aquáticos. Cabe lembrar que *Aeromonas* não necessitam de um hospedeiro humano ou animal para se multiplicar (Rocha, 2004).

Análises de água de abastecimento e escoamento de abatedouros de bovinos em Porto Alegre (RS) permitiram constatar a presença de *Aeromonas* em 21,4% das amostras, o que sugeriu como fonte de contaminação a água de abastecimento (Bizani & Brandelli, 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Rossi Júnior *et al.*, (2000) em outros abatedouros.

Além dos ambientes aquáticos, as *Aeromonas* são encontradas em um grande número de alimentos frescos tanto de origem animal como vegetal, e alimentos processados, inclusive naqueles refrigerados (Buchanan & Palumbo, 1985; Saad *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000). Dentre os alimentos de origem animal *Aeromonas* spp. já

foram isoladas de carnes cruas, carcaças de frango, peixes, frutos do mar, aves, leite e derivados e ovos (McMahon & Wilson, 2001; Costa & Rossi Júnior, 2002; Carneiro e Rossi Júnior, 2006; Canals *et al.*, 2007). No Brasil, a presença de *Aeromonas* foi constatada em 43% das amostras de vegetais comercializados na CEASA de São Paulo (Saad *et al.*, 1995), com números que variavam entre  $10^2$  a  $2 \times 10^6$  UFC/g.

No caso do leite, a contaminação do mesmo com *Aeromonas* veiculada pela água é relevante uma vez que Amaral *et al.* (2006) sugerem que a água utilizada nas propriedades leiteiras pode constituir um fator de risco para a saúde dos seres humanos que utilizam essa água para consumo ou na produção do leite. Carneiro & Rossi Júnior (2006) verificaram a ocorrência de *Aeromonas* spp. em 46,25% das amostras de leite colhidas em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento do leite tipo A. Considerando que as bactérias do gênero *Aeromonas* possuem capacidade de sobreviver e multiplicar em alimentos mantidos sob refrigeração, como o leite, e que muitas cepas são capazes de produzir toxinas, sua presença em leite pasteurizado, pode conferir a este produto um sério risco à saúde, principalmente, para o segmento da população considerada de alto risco, como criança, idosos e pacientes imunodeprimidos.

Já em aves, Costa & Rossi Júnior (2002) avaliaram 200 amostras de diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frangos. Isolaram *Aeromonas* spp. em 36% das amostras de penas, em 56% de fezes, em 72% de carcaças evisceradas, não evisceradas, e resfriadas, e em 80% de água de pré-resfriamento.

Em peixes, Castro-Escapurlli *et al.* (2003) evidenciaram a presença de *Aeromonas* em 32,8% das 250 amostras de peixes congelados de água doce, comercializados no México. A caracterização bioquímica dos isolados mostrou: *A. salmonicida* (35,36%), *A. hydrophila* (20,73%), *A. caviae* (17,07%), *A. veronii* bv *sobria* (13,42%) e *A. eucrenophila* (13,42%). Por

outro lado, em estudo realizado na Turquia, *Aeromonas* foram isoladas de apenas 15,8% dos salmões retirados do Mar Negro (Dugenci & Candan, 2003).

Bulhões *et al* (2002), investigando queijos minas frescal tipo artesanal, adquiridas no comércio varejista dos municípios de Poços de Caldas - MG e Jaboticabal - SP, encontraram *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. schubertii*, sendo que 51,2% das amostras estavam contaminadas por estes microrganismos com concentrações que variaram de  $5,0 \times 10^3$  a  $4,0 \times 10^5$  UFC/g.

McMahon & Wilson (2001) investigaram a ocorrência de patógenos entéricos e espécies de *Aeromonas* em vegetais orgânicos. Os pesquisadores observaram que *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* e *Listeria* não foram encontradas em nenhuma das amostras analisadas, enquanto que foram isoladas 34% de espécies de *Aeromonas*, nas amostras analisadas.

Examinando a superfície das mãos de manipuladores de carne bovina, em um matadouro do Estado de São Paulo, Rossi Júnior *et al.*, (2000) evidenciaram amostras contaminadas por espécies do gênero *Aeromonas*.

As variáveis que determinam à distribuição e a incidência de diferentes espécies de *Aeromonas* isoladas de águas, alimentos ou isolados clínicos, assim como suas propriedades de virulência associadas, podem ser alteradas de acordo com a região de localização geográfica (Bizani & Brandelli, 2001). Fatores que favorecem a variabilidade e a estabilidade destes microrganismos em alimentos são, em sua maior parte, atribuída a condições de: pH, umidade, e principalmente, temperatura, considerando uma larga escala de tolerância, que pode oscilar de 5 a 42°C (Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2003). Além da capacidade de crescimento em baixas temperaturas, algumas espécies de *Aeromonas* apresentam tolerância à salinidade (Delamare *et al.*, 2000), o que lhes confere o potencial de manter elevada



viabilidade ou mesmo, crescer em concentrações salinas comumente utilizadas na conservação de produtos alimentícios de origem animal e vegetal.

### **2.1.2 Aspectos clínicos associados a bactérias do gênero *Aeromonas***

Nas últimas décadas as *Aeromonas* spp. têm sido reconhecidas como patógenos humanos emergentes. Seja através da ingestão direta de água contaminada ou de alimentos contaminados pela água, *Aeromonas* spp. podem provocar o desenvolvimento de diversas doenças no homem, além de infecções gastrointestinais, que variam de diarreias amenas a disenterias graves (Amaral *et al.*, 2006). Entre elas destacam-se: meningites, artrites, endocardites, osteomielites, peritonites, infecções cutâneas, infecções do trato respiratório (Burke *et al.* 1983; Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000; Bizani & Brandelli, 2001; Koneman *et al.*, 2001; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Nawaz *et al.*, 2006), infecções do trato urinário, como cistite (Al-Benwan *et al.*, 2007), síndrome urêmica hemolítica (Janda *et al.*, 1995), e menos comumente com septicemia em pacientes imunodeprimidos (Canals *et al.*, 2007), entre outras. Isolados de *Aeromonas* foram detectados em feridas de pacientes que sofreram lesão seguida de exposição à água (Ghenghesh *et al.*, 2001), sendo *A. hydrophila* o principal agente causal nestes casos (Abbott *et al.*, 2003). Estes fatos tornam o gênero de interesse clínico e de saúde pública. (Janda *et al.*, 1995; Albert *et al.*, 2000).

Ainda que *Aeromonas* spp esteja amplamente distribuída no ambiente, alguns investigadores questionam a associação de sua presença ao aumento da frequência de doenças diarreicas. Joseph & Carnahan (2000), entretanto, entendem que esse fato é decorrente do grande número de casos não notificados.

Segundo Abbott *et al.* (2003), a gastroenterite é a infecção humana mais prevalente causada por *Aeromonas* spp. As gastroenterites associadas a estes microrganismos acometem

principalmente crianças menores de cinco anos de idade, porém, casos em adultos são freqüentes (Burke *et al.* 1983; Janda *et al.*, 1995; Nojimoto *et al.*, 1997). Em humanos, as infecções gastrointestinais, são atribuídas à ação de enterotoxinas. As espécies mais relatadas neste quadro clínico são *A. caviae*, *A. hydrophila*, e *A. veronii* biovar *sobria* (Janda & Abbott, 1998).

A gravidade das infecções gastrointestinais por *Aeromonas* é variada, podendo ser autolimitada ou apresentar-se como uma doença severa semelhante à cólera. O paciente com gastrenterite por *Aeromonas* apresenta diarréia líquida, febre, vômitos, dor abdominal, e em casos mais graves, diarréia mucosanguinolenta (Buchanan & Palumbo, 1985). A incidência de gastrenterite por *Aeromonas* tende a ser mais elevada no período de verão do que em outras estações (Burke *et al.* 1983). Na Austrália, Kirov (1993a) constatou aumento dos níveis de *Aeromonas* na água tratada coincidindo, com o aumento de sua incidência associada a gastrenterites nos meses de verão.

Estudos demonstram uma ligação direta entre a ingestão de alimentos contaminados com espécies de *Aeromonas* e o desenvolvimento de doenças gastrointestinais (Saad *et al.*, 1995; Janda *et al.*, 1995; Altwegg, 1999; Koneman *et al.*, 2001; Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2003).

A possibilidade de que gastrenterites por *Aeromonas* seja conseqüência da ingestão de toxinas pré-formadas presentes nos alimentos (Majeed *et al.*, 1990) é reforçada pela constatação de que estas bactérias são capazes de produzir enterotoxinas e hemolisinas mesmo a temperaturas de 4°C (Palumbo, 1996).

Estudos realizados na Líbia permitiram detectar *Aeromonas* em 15% de crianças com diarréia e 18% de crianças sem diarréia, sendo *A. caviae* a espécie mais freqüente (Ghenghesh *et al.*, 2001). No Irã foram analisadas 50 amostras fecais, isolando *A. hydrophila* em 28 (56%) de amostras diarréicas e 22 (44%) em um grupo controle (Aslani & Hamzeh, 2004). Na Índia,

Subashkumar *et al.* (2006) confirmaram a presença de *A. hydrophila* em 9,7% de amostras diarréicas em crianças.

No estado do Rio Grande do Sul, Guerra *et al.* (2001), identificou bactérias do gênero *Aeromonas* em 57,4% das diarréias bacterianas em pacientes hospitalizados, evidenciando maior incidência em crianças. Já Zanella (2002) detectou a ocorrência de *Aeromonas* em fezes (não diarréicas) de trabalhadores de aviários da região noroeste do Estado.

### **2.1.3 Fatores de virulência e resistência a antibióticos em *Aeromonas***

O mecanismo de patogenicidade das *Aeromonas* é considerado multifatorial, produzindo uma grande variedade de fatores de virulência (Yu, *et al.*, 2005; Carneiro & Rossi Júnior, 2006; Pillai *et al.*, 2006). Dentre os principais fatores de virulência podem ser destacados, diferentes formas de pili, cápsulas, 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 formação de biofilme (Erova *et al.*, 2006).

Algumas cepas de *Aeromonas* possuem ampla gama de fatores de virulência, e alta capacidade invasiva. Muitos autores relacionam a virulência de *Aeromonas* com a produção de enzimas proteolíticas extracelulares (Cascón *et al.*, 2000; Albert *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Fadanelli, 2005). Estes fatores incidem tanto em cepas de origem ambiental, como em amostras clínicas (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Subashkumar *et al.*, 2006).

As enterotoxinas produzidas por *Aeromonas* são substâncias extracelulares que podem agir sobre o epitélio intestinal produzindo inflamação. Neste sentido, Albert *et al.* (2000) identificaram três genes de 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 toxina que possui atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica.

A atividade hemolítica em isolados de *A. hydrophila* foi verificada na década de 60 e Wretlind *et al.* (1971) identificaram duas hemolisinas, mediante focalização isoelétrica: a aerolisina (AerA), correspondente a enterotoxina citotóxica Act (Albert *et al.*, 2000) e a hemolisina HlyA, semelhante aquela produzida por *Vibrio cholerae* (Zhang *et al.*, 2000).

A expressão de muitos destes fatores de virulência está associada com a alta densidade celular e, por isso, são controlados pelo *quorum sensing*. “Quorum sensing” é um mecanismo de controle da expressão gênica em resposta ao aumento da população bacteriana (Swift *et al.*, 1999). Estudos mostram que as espécies de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, apresentam o mecanismo *quorum sensing*, e que em *A. hydrophila*, a atividade da metaloprotease, o desenvolvimento de biofilme e a fermentação butanodiol, são controlados pelo *quorum sensing* (Jangid, *et al.*, 2007).

Burke *et al.* (1983) avaliando os microorganismos responsáveis pela diarreia infantil demonstraram que as espécies de *Aeromonas* produtoras de enterotoxinas apresentam biótipos similares. Neste sentido, verificaram que testes para detecção de hemolisina são capazes de discriminar amostras enterotóxicas das não-enterotóxicas com 97% de precisão. Em um estudo da associação de *A. sobria* com infecção humana, Daily *et al.* (1981) demonstraram que as linhagens citotóxicas isoladas apresentavam atividade hemolítica.

A produção de toxinas por cepas de *Aeromonas*, em amostras clínicas, apresentou uma maior percentagem em relação à amostras de alimentos como relatam Martins *et al.*, (2002).

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 (Snellman *et al.*, 2002), 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 atividade máxima para hidrólise de ésteres e, para triacilgliceróis. Verificou-se que esta lipase apresentou elevada atividade no início da fase estacionária do crescimento celular com uma faixa de pH ótimo entre 7,5 - 8,0. A atividade máxima da enzima foi obtida a uma temperatura de 37°C, sendo que, após 30 minutos de incubação a 55°C, apenas 20% da atividade enzimática foi mantida (Chuang *et al.*, 1997).

Além da proteína Lip, as *Aeromonas* são capazes de produzir uma outra lipase extracelular, codificada pelo gene *lipH3*. Esta é capaz de degradar derivados do p-nitrofenil, bem como triacilgliceróis de C<sub>4</sub> a C<sub>8</sub> (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).

Devido à importância da lipase na nutrição bacteriana e como fator que afeta as funções do sistema imunológico pela geração de ácidos graxos livres, Cascón *et al.* (2000) têm proposto a identificação do gene *lipA*, através da técnica da PCR, para a avaliação da patogenicidade de isolados de *Aeromonas*. Chacón *et al.* (2003) também relataram em seus estudos uma elevada prevalência do gene *lipA*, já que dos 234 isolados de *Aeromonas* analisados, 221 apresentaram resultados positivos através da técnica da PCR. Em outro estudo, Cascón *et al.* (2000), constataram que 100% dos isolados de *Aeromonas* sp. analisados apresentaram atividade lipolítica quando plaqueados em meio ágar LB (Lúria Bertani) suplementado com 0,5% de tributirim. Fadanelli (2005) também confirmou a alta

prevalência do gene *lipA* em isolados de *Aeromonas*, apontando a possibilidade de utilização deste gene na identificação rápida de espécies deste gênero.

Estruturas de superfícies, como Pili, Fimbrias e Adesinas, podem estar envolvidos na adesão a células hospedeiras ou no reconhecimento dos receptores das células hospedeiras, associados ao processo de colonização celular (Seshadri *et al.*, 2006).

Em termos de resistência a antibióticos, pesquisas realizadas com estirpes de *Aeromonas* isoladas de fontes ambientais, alimentos e espécimes clínicos, mostraram que essa bactéria pode apresentar resistência a um ou mais antibióticos beta-lactâmicos, em decorrência da presença de genes que codificam metalo-beta-lactamases. Por outro lado, a sua ampla distribuição, associação com animais e desenvolvimento em sistemas aquáticos e no solo, ajudam a imprimir uma importante pressão de seleção para resistência a outros antibióticos como tetraciclina, sulfas, etc. Além disso, estas bactérias apresentam elevada capacidade de intercâmbio de genes entre si e com outros grupos bacterianos (enterobactérias, vibrios, etc.) (Costa *et al.*, 2003; Carli, 2006).

Carneiro e Rossi Júnior (2006), analisando 37 cepas de *Aeromonas* spp., isoladas do fluxograma de beneficiamento de leite tipo A, encontraram 100% dos isolados resistentes à ampicilina, 75,67% à cefalotina, 64,86% à ceftioxina e 48,64% ao aztreonam. Ressaltam ainda as drogas as quais as cepas mostraram-se menos resistentes – clorafenicol, amicacina, gentamicina, tetraciclina e tobramicina.

Verificando o impacto de efluentes urbanos sobre a resistência a antibióticos Goñi-Urriza *et al.* (2000a) notaram que as cepas de enterobactérias foram sempre menos resistentes do que as *Aeromonas* spp.

Em outro estudo, Goñi-Urriza *et al.* (2000b) ressaltaram que tanto a presença de *Aeromonas* spp quanto a sua resistência a antibióticos está associada à densa população humana.

A resistência à ampicilina é uma característica normalmente encontrada em bactérias do gênero *Aeromonas*, particularmente nas espécies consideradas patogênicas para humanos, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* (Goñi-Urriza *et al.*, 2000b; Costa *et al.*, 2003; Carneiro & Rossi Júnior, 2006). Esta frequência é tão elevada que este antibiótico é utilizado na maior parte dos meios empregados para o isolamento destas bactérias (Albert *et al.*, 2000; Abbott *et al.*, 2003). Entretanto, em outras espécies de *Aeromonas*, como *A. trota*, a sensibilidade à ampicilina parece uma constante.

Trabalhos realizados em nosso laboratório com isolados de *Aeromonas* apresentaram além da resistência à ampicilina, percentagens elevadas de resistência a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A percentagem de resistência ao aztreonam foi de 44%, 40% para ceftazidima, 29% para ceftriaxona e cefotaxima, e 11% para cefoxitina. Quanto à resistência a outros antibióticos, elevada frequência de resistência a cloranfenicol (18%), tetraciclina (16%) e sulfa (15%) foram constatadas entre os isolados analisados. Estes valores diferem em parte daqueles obtidos por Goñi-Urriza *et al.* (2000b) que observaram uma frequência de 14% de isolados resistentes à tetraciclina, baixa frequência de resistência ao cloranfenicol, e alta eficiência do cotrimazol sobre isolados de *Aeromonas* obtidos de águas fluviais.

## **2.2 Sistemas de transporte**

Um importante aspecto para fisiologia bacteriana seja para bactéria patogênica ou não é a capacidade de obter nutrientes dos ambientes que as envolvem. São conhecidos quatro tipos de sistema de transporte de nutrientes em bactérias. O primeiro sistema utiliza canais protéicos que formam poros na membrana citoplasmática que funcionam por difusão facilitada sem gasto de energia. O segundo catalisa o transporte “uni”, “anti” ou “simporte” de

solutos. O terceiro são os transportadores primários e empregam a hidrólise do ATP como fonte de energia para transporte ativo e o quarto e último grupo de transportadores consiste nos translocadores que fosforilam seus substratos durante o seu transporte (Paulsen *et al.*, 2000).

Os sistemas de transporte dependentes de energia são classificados como primários e secundários, em função do tipo de energia empregada. Os sistemas primários utilizam energia gerada pela clivagem do ATP, enquanto que os sistemas secundários fazem uso de outras fontes de energia celulares, como força promotora. Entre os transportadores primários, destacam-se aqueles que ligam e hidrolisam ATP, transportadores energia-dependentes, também chamados de transportadores ABC (do inglês *ATP-Binding Cassete*). Os transportadores ABC são amplamente distribuídos em diferentes organismos (Dassa & Bouige, 2001; Higgins, 2001; Tanabe *et al.*, 2006; Ponte-Sucré, 2007). Por exemplo, o genoma humano codifica 48 transportadores ABC (Oswald *et al.*, 2006), enquanto que em *Escherichia coli*, o genoma codifica 79 transportadores tipo ABC (Harland *et al.*, 2005).

Transporte de moléculas através da membrana celular desempenha importante papel em muitos processos celulares em todos os organismos, incluindo o reconhecimento e captação de nutrientes e a excreção de substâncias, ou seja, eliminação de resíduos, além de geração de energia e sinalização celular (Hollenstein *et al.*, 2007a; Linton & Higgins, 2007).

Em bactérias patogênicas este sistema pode representar uma função importante na sobrevivência e patogenicidade bacteriana (Harland *et al.*, 2007).



### 2.2.1 Transportadores do tipo ABC

A captação de substâncias através de membranas celulares, em particular, de bactérias, é realizada por diferentes processos como difusão passiva, facilitada, ou ainda, por mecanismos de transporte ativo. Sistemas de transporte de nutrientes em bactérias podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários, sensíveis ao choque osmótico e energizado diretamente pela hidrólise de ATP e os sistemas secundários, insensíveis ao choque osmótico e utilizadores do gradiente eletroquímico de membrana para extrair a energia necessária ao seu funcionamento (Dassa, 2000). Entre os sistemas primários de transporte destacam-se os sistemas de transporte do tipo ABC (*ATP-Binding Cassete*). Estes sistemas são responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de diferentes moléculas através da membrana citoplasmática, catalisando o reconhecimento de nutrientes essenciais e/ou a excreção de substâncias tóxicas (Linton & Higgins, 1998; Higgins, 2001; Garmory & Titball, 2004; Harland *et al.*, 2005).

Sistemas ABC estão envolvidos não somente na captação ou excreção de uma grande variedade de substâncias, mas também em muitos processos celulares e em sua regulação (Dassa & Bouige, 2001).

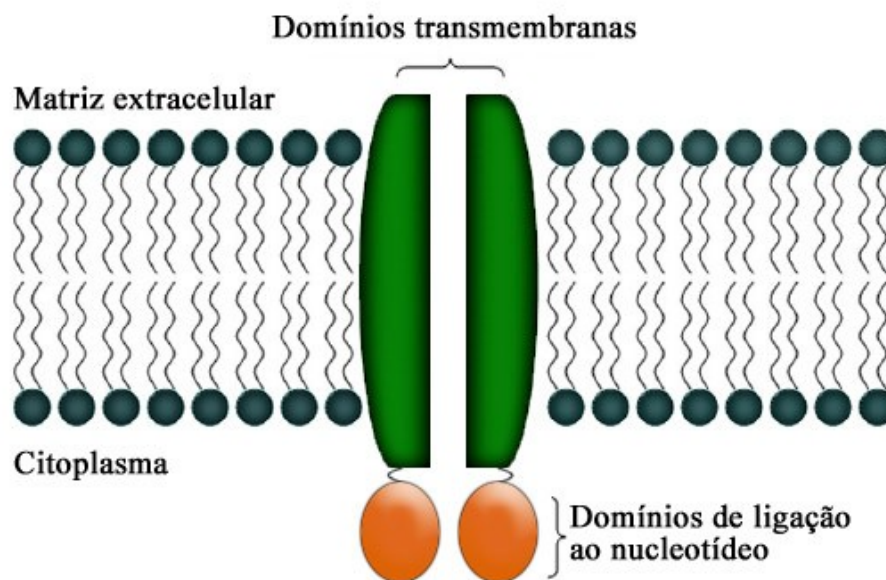
O sistema de transporte do tipo ABC, constitui uma das maiores famílias de proteínas transmembranas, sendo ubíquas na natureza, são empregados por arqueas, eubactérias e eucariotos (Ren & Paulsen, 2005). A família dos transportadores ABC pertence ao principal grupo de transportadores dependentes de energia e uma das maiores famílias transportadoras responsáveis por diversos processos celulares usando a energia livre proveniente da hidrólise do ATP (Schmitt & Tampe, 2002; Jones & George, 2004; Tanabe *et al.*, 2006).

Os transportadores ABC são divididos em dois subtipos, baseados na direção do transporte, ou seja, sistema de importação (captação) e sistema de exportação (excreção) (Dawson & Locher, 2006).

Em bactérias, são encontrados muitos transportadores ABC que importam ou captam nutrientes, como os sistemas de captação de maltose ou glicose (Oswald *et al.*, 2006). Os transportadores ABC importadores, ou seja, de captação, estão frequentemente envolvidos no transporte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento bacteriano, tais como – peptídeos, aminoácidos, açúcares e outros carboidratos, ferro, e outras, incluindo substâncias raras como o molibdênio, e são por isso, conseqüentemente importantes para o metabolismo bacteriano. Além disso, a inativação deste sistema ABC de captação pode conduzir a não-virulência (Harland *et al.*, 2005; Hollenstein *et al.*, 2007a). Já os transportadores ABC de excreção funcionam para expulsar ou exportar substâncias tóxicas, como hemolisinas, drogas e antibióticos, e por isso, estão diretamente associados à resistência aos antibióticos, à virulência, patogenicidade, e conseqüentemente a sobrevivência bacteriana (Harland *et al.*, 2005; Burke & Ardehali, 2007).

Sem levar em conta a direção do transporte (captação ou excreção), a natureza do substrato transportado, ou a fisiologia funcional, transportadores ABC são constituídos por quatro domínios estruturais: dois domínios transmembranas (transmembrane domains - TMDs) e dois domínios de ligação nucleotídica (nucleotide-binding domains - NBDs), localizados na superfície citosólica da membrana (Jones & Jorge, 2004; Lu *et al.*, 2005; Zaitseva *et al.*, 2006; Burke & Ardehal, 2007), como demonstrado na Figura 1. O primeiro componente é formado por duas proteínas hidrofóbicas que atravessam a membrana citoplasmática, e por isto, denominados domínios transmembranas ou domínios integrais de membrana. Este domínio é responsável pela formação do poro por onde o substrato será transportado (Dassa & Bouige, 2001; Hollenstein *et al.*, 2007b; Harland *et al.*, 2007). O

segundo componente dos sistemas ABC de transporte é formado por dois domínios geradores de energia, representando por duas proteínas hidrofílicas associadas à face interna da membrana citoplasmática que liga e hidrolisa ATP, denominado domínios de ligação nucleotídica (Young & Holland, 1999; Harland *et al.*, 2007; Burke & Ardehali, 2007; Ponte-Sucre, 2007). Além destas, outras proteínas também podem estar envolvidas na captação ou excreção de substâncias através dos sistemas ABC (Harland *et al.*, 2005).



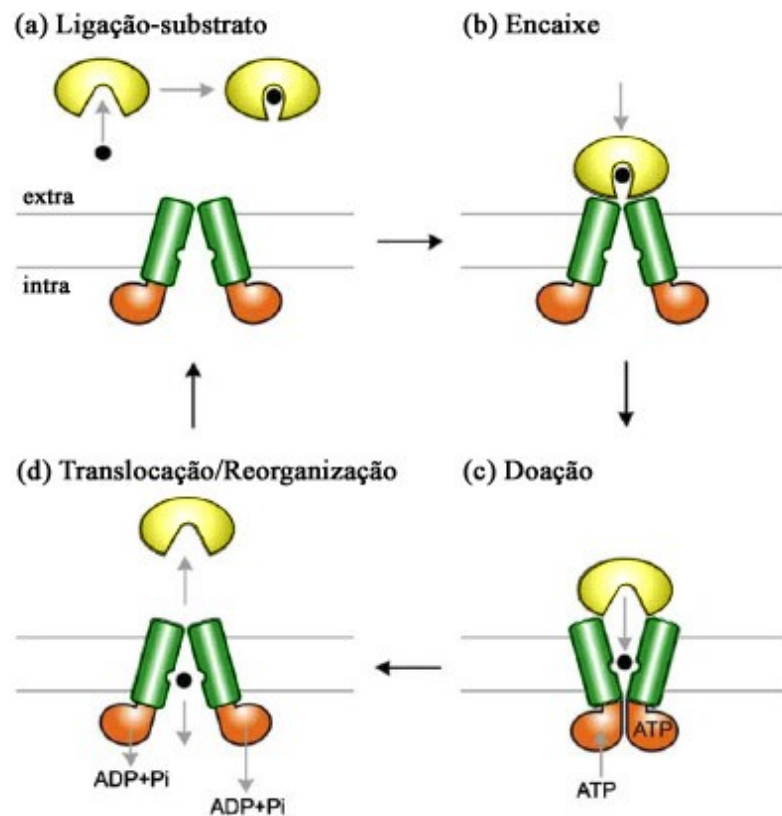
**Figura 1.** Representação esquemática de um típico transportador do tipo ABC em membrana celular. O domínio transmembrana forma o poro através da membrana citoplasmática e juntamente com o domínio de ligação nucleotídica associado, o qual é encontrado na face citosólica da membrana. (Figura adaptada de Burke & Ardehali, 2007).

A idéia de que um transportador ABC típico consiste de quatro domínios foi estabelecida muitos anos atrás. Estes quatro domínios apresentam a forma mínima da unidade funcional, todos necessários para o transporte (Linton & Higgins, 2007).

Transportadores ABC de captação, presente somente em procariotos, requer além dos dois domínios (domínios transmembranas – TMDs, e domínios de ligação nucleotídica NBDs) um terceiro componente, uma proteína de ligação ao substrato (Substrate Binding Protein - SBP), que entrega o substrato capturado ao domínio transmembrana (Higgins & Linton, 2004; Hollenstein *et al.*, 2007a). Em bactérias Gram-negativas esta proteína encontra-se livre no espaço periplasmático, enquanto que em bactérias Gram-positivas encontra-se ancorada a face externa da membrana citoplasmática por meio de uma acil-gliceril-cisteína N-terminal (Dassa & Bouige, 2001; Harland *et al.*, 2007; Nepomuceno *et al.*, 2007). A proteína de ligação geralmente determina o substrato específico que será transportado pelo sistema (Detmers *et al.*, 2001).

Em contraste ao transportador ABC de captação, o sistema ABC de excreção recruta este substrato diretamente do citoplasma ou de organelas celulares internas ou externas (Hollenstein *et al.*, 2007a; Linton & Higgins, 2007), não necessitando de um terceiro componente. Este sistema é encontrado em todas as formas vivas, variando de microrganismos a humanos. O transportador ABC de excreção pode ser encontrado nas membranas citoplasmáticas de procariotos e eucariotos, bem como em organelas citoplasmáticas de organismos superiores – retículo endoplasmático, membrana mitocondrial interna, peroxissomos e membrana de vacúolos. Transportadores multidrogas da família ABC facilita a excreção de diversas drogas citotóxicas através da membrana celular (Dawson & Locher, 2006). Embora a estrutura dos quatro domínios (dois domínios transmembranas e dois domínios de ligação nucleotídica) é comum para este tipo de transporte, o sistema ABC de excreção é menos complexo quando comparado ao sistema ABC de captação, porque este não necessita da proteína de ligação ao substrato para ser funcional. A direção do transporte pode ser definida pela presença ou não deste último componente, a proteína de ligação ao substrato (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; Harland *et al.*, 2007).

O mecanismo do sistema ABC de captação compreende quatro etapas, como podemos observar na figura 2: (a) ligação do substrato a proteína de ligação (SBP); (b) em seguida, ocorre o encaixe desta proteína carregando o substrato ao sítio localizado no interior do domínio transmembrana (TMD) e posteriormente um sinal ao domínio de ligação nucleotídica (NBD), para cooperativamente ligar o ATP; (c) o domínio transmembrana torna disponível o lado externo, e a proteína de ligação libera o substrato que é então doado ao sítio de ligação do domínio transmembrana; (d) em seguida, ocorre então o transporte do substrato e a reorganização do sistema para iniciar um novo ciclo. O substrato chega ao citoplasma e a proteína de ligação é liberada do domínio transmembrana (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Modelo do mecanismo de translocação do transportador ABC, proteína de ligação ao substrato-dependente. (Figura adaptada de Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

Os domínios transmembranas (TMDs), formam o sítio de ligação da proteína que carrega o substrato, e juntamente sinaliza a tradução ao domínio de ligação nucleotídica para acoplar a hidrólise do ATP. O motor do transporte ABC são os domínios de ligação nucleotídica (NBDs), que fornecem a energia necessária para o transporte do substrato através da ligação e hidrólise do ATP (Hollenstein *et al.*, 2007a).

Os transportadores do tipo ABC bacterianos são sistemas de transporte extremamente versáteis variando grandemente no tamanho e na função para captar (importar) e/ou expulsar (exportar) diversas substâncias (Linton & Higgins, 1998; Higgins, 2001; Harland *et al.*, 2005; Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; Burke & Ardehali, 2007), sugerindo que estes sistemas são, provavelmente, necessários para o crescimento, sobrevivência, competitividade e patogenicidade bacteriana em diferentes ambientes (Nicolás *et al.*, 2007; Harland *et al.*, 2007). A expressão é variável de acordo com a espécie: por exemplo, o genoma de *E. coli* codifica 79 possíveis sistemas ABC, enquanto que em *Mycobacterium tuberculosis* o genoma codifica 25 possíveis sistemas ABC. O estilo de vida destas duas bactérias difere grandemente e por isso é considerado possível que o número de sistemas ABC codificados difere entre bactérias com estilos de vida diferentes, refletindo esta necessidade particular (Harland *et al.*, 2005).

O interesse aumento no sistema de transporte do tipo ABC pode ser explicado pelo seu potencial como alvo no desenvolvimento de agentes anti-tumorais, vacinas antibacterianas e antimicrobianas (Nicolás *et al.*, 2007). Além disso, transportadores ABC também foram identificados como alvo para o desenvolvimento de vacinas contra bactérias patogênicas (Garmory & Titball, 2004.).

Os sistemas de transporte do tipo ABC podem ser identificados “in silico” usando uma grande variedade de diferentes métodos. Estes incluem identificação através de genes

homólogos de sistemas ABC já conhecidos, comparação da relação ortólogos/parólogos entre os componentes do sistema ABC de diferentes organismos ou através do uso de seqüências específicas para o sistema ABC (Harland *et al.*, 2005).

### **2.2.2 Sistemas de transporte de oligopeptídeos – Sistema Opp**

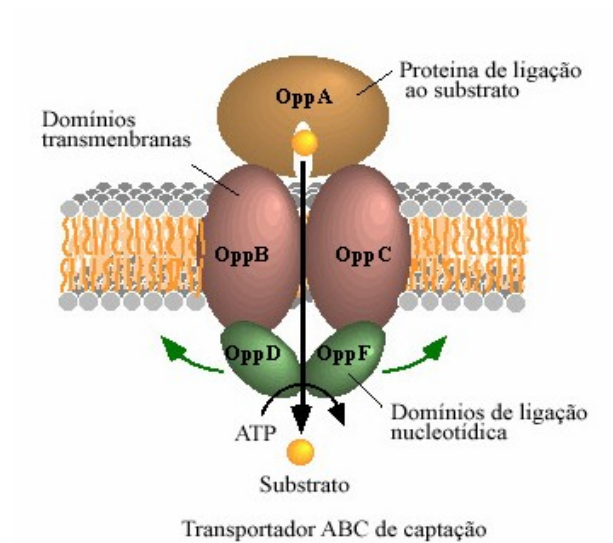
Os peptídeos representam um elemento importante na nutrição da maioria dos seres vivos, em particular das bactérias, servindo como fonte de aminoácidos (Monnet, 2003; Medrano *et al.*, 2007). Devido a sua importância na aquisição de peptídeos, bactérias possuem múltiplos sistemas transportadores de peptídeos com sobreposição de funções. No entanto, além desta função, na aquisição de nutrientes, componentes do sistema transportador de peptídeos auxiliam as bactérias em respostas às mudanças em seu ambiente, mediando funções como *quorum sensing*, esporulação e transporte de ferormônios (Wang *et al.*, 2004). Assim sendo, a capacidade de captar peptídeos torna-se, portanto, uma propriedade essencial para a sobrevivência das bactérias em diferentes ambientes (Payne & Gilvarg, 1968; Hilles & Higgins, 1986).

O sistema de transporte de oligopeptídeos (Opp) é um transportador do tipo ABC (ATP-Binding Cassette) de captação, formado por proteínas associadas à membrana citoplasmática, responsáveis pelo transporte de peptídeos (Hilles & Higgins, 1986; Nepomuceno *et al.*, 2007). Estes sistemas têm sido identificados em uma grande variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como por exemplo, em *Salmonella typhimurium*, onde o sistema Opp foi primeiramente identificado, e é codificado por 5 genes *opp*, organizados na forma de um operon policistrônico (Hilles & Higgins, 1986). Este sistema

pode transportar uma grande variedade de substratos peptídicos, em contraste com muitos outros transportadores, os quais têm um limitado número de substratos (Solomon *et al.*, 2003).

Tipicamente, o sistema Opp compreende cinco componentes funcionais, como podemos observar na figura 3. As proteínas transmembranas integrais OppB e OppC (domínios transmembranas ou domínios integrais de membrana), são responsáveis pela formação de um canal através da membrana citoplasmática, utilizado para o transporte de peptídeos. As duas proteínas de membrana citoplasmáticas OppD e OppF (domínios de ligação nucleotídica ou domínios de ligação ao ATP), provem energia necessária para o transporte dos peptídeos. Por fim, a proteína OppA (SBP – Substrate Binding Protein), proteína de ligação ao substrato, responsável pela captação de peptídeos do meio externo, e em seguida, levá-lo ao poro formado pelo domínio transmembrana (OppB e OppC). Em bactérias Gram-negativas, esta proteína encontra-se no espaço periplasmático, enquanto que em bactérias Gram-positivas é uma lipoproteína. Esta proteína liga o substrato peptídico e facilita esta captação interagindo e entregando o peptídeo ao complexo OppBCDF. As proteínas ligadoras de oligopeptídeos (OppA) de diferentes espécies bacterianas, variam de acordo com o microrganismo em que se encontram (Hilles & Higgins, 1986; Monnet, 2003). Essas proteínas são versáteis e podem acomodar peptídeos de 2 a 18 resíduos independentes da composição de aminoácidos (Monnet, 2003). Como por exemplo, o sistema Opp de *Lactococcus lactis* tem preferência por peptídeos contendo de quatro até pelo menos dezoito resíduos (Detmers *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2003). A ligação do substrato à proteína OppA evita também o retorno do peptídeo ao meio externo (Higgins *et al.*, 1983). De fato, a atividade seletiva na ligação ao peptídeo das OppAs é expressado por espécies bacterianas e pode refletir na restrição da permeabilidade da membrana celular e em estratégias nutricionais, ambos requeridos para a sobrevivência em diferentes ambientes (Monnet, 2003).





**Figura 3.** Transportador ABC de *Salmonella typhimurium* LT2. Figura disponível (on-line) <http://www.genome.ad.jp.keeg> (12/02/2008).

Usualmente os genes *opp* responsáveis pela síntese destas proteínas, estão organizados na forma de um operon policistrônico (Hilles & Higgins, 1986; Young & Holland, 1999; Hiron *et al.*, 2007; Nepumoceno *et al.*, 2007).

### 2.2.2.1 Proteína de ligação aos oligopeptídeos - OppA

Proteínas de ligação a oligopeptídeos (OppA) mediam a ligação destes oligopeptídeos requeridos para nutrição em diversas espécies bacterianas e participam em diferentes funções fisiológicas, incluindo formação de parede celular de muropeptídeos em *E. coli* e *S. typhimurium* (Goodell & Higgins, 1987), controle da esporulação em *Bacillus subtilis* (Balan *et al.*, 2008), modulação da expressão gênica entre diferentes bactérias Gram

positivas (Rudner *et al.*, 1991; Lazazzera *et al.*, 1997) e regulação de fatores associados à virulência (Borezee *et al.*, 2000; Balan *et al.*, 2008).

A definição da estrutura tridimensional da proteína OppA de *S. enterica* serovar *typhimurium* e da proteína AppA de *Bacillus subtilis*, ambas de ligação a oligopeptídeos, revelou um modelo molecular comum, compreendendo três domínios estruturais: domínios I e III contendo o ligante, e domínio II relatado não diretamente por ligar o ligante (Levdikov *et al.*, 2005; Moutran *et al.*, 2007). O sítio de ligação do ligante é formado pela fenda entre os domínios I e III conectados por uma articulação flexível, permitindo a completa imersão de oligopeptídeos no mecanismo “Venus FlyTrap-Like”. Há poucas interações diretas entre OppA e cadeias de oligopeptídeos, explicando, pelo menos em parte, o reconhecimento e a ligação para uma grande variedade de peptídeos (Levdikov *et al.*, 2005). Deste modo, a especificidade de ortólogos OppA tem sido, principalmente, determinada por ensaios *in vivo* e *in vitro* empregando peptídeos sintéticos e purificação de proteínas ou células vivas (Detmers *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004).

É notável observar, que para realizar uma eficiente ligação de oligopeptídeos, a proteína OppA é essencial, para tanto, é produzida com estequiometria superior, quando comparada aos demais componentes do sistema Opp. Conseqüentemente, a proteína OppA de bactérias Gram-negativas têm sido descrita como a mais abundante proteína periplasmática em *Salmonella typhimurium* e, particularmente, em *Escherichia coli*, onde a concentração pode chegar a 1,0 mM (Monnet, 2003). Em *S. typhimurium*, a OppA supera em aproximadamente 50 vezes a concentração dos outros componentes Opp associados à membrana (Higgins & Hardie, 1983).

Em algumas bactérias, duas cópias do operon Opp têm sido identificadas. Em *Bacillus subtilis*, um segundo sistema Opp, chamado App, tem sido descrito. Este é composto

por proteínas homologas OppA, OppB, OppC, OppD e OppF, entretanto, os genes codificados são ligados na ordem *oppD*, *oppF*, *oppA*, *oppB* e *oppC* (Monnet, 2003).

O sistema de transporte de peptídeos não representa somente um importante papel na nutrição celular, mas em microrganismos eles também são envolvidos na sinalização de vários processos celulares. Estes incluem a sinalização intra e intercelular, desenvolvimento de competência, esporulação, transferência de material genético por conjugação, desenvolvimento de virulência e na síntese da parede celular (Payne & Gilvarg, 1968; Hiles & Higgins, 1986; Detmers *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2003; Staats *et al.*, 2007). Além disto, alguns pequenos peptídeos possuem funções biológicas importantes como efeito hormonal, tóxico ou ação antibiótica (Monnet, 2003). A capacidade de captar peptídeos torna-se, portanto, uma propriedade essencial para a sobrevivência das bactérias em diferentes ambientes (Payne & Gilvarg, 1968; Hilles & Higgins, 1986).

Com relação às bactérias Gram-positivas há relatos da participação do sistema Opp, em especial da proteína OppA, na capacidade da eubactéria *Listeria monocytogenese* em resistir a ação de lisossomos, pelo acúmulo de peptídeos, uma característica importante em um patógeno intracelular e na proteção bacteriana à baixas temperaturas, que permite esta manter sua capacidade de crescimento em temperaturas, tais como 0°C, aparentemente independente do sistema de choque-frio desta bactéria (Borezze *et al.*, 2000).

Em *Enterococcus faecalis* o sistema Opp está diretamente relacionado à indução de transferência de material genético por conjugação pela captação de um ferormônio (cCF10) produzido por esta espécie, além de um possível papel de sinergismo estar presente entre este sistema e o sistema Opp de transporte encontrado em *E. faecalis*, em especial entre a proteína PrgZ (componente ligante) e os domínios transmembranas e domínios de ligação ao nucleotídeo do sistema Opp (Leonard, 1996; Monnet, 2003). Ferormônios são pequenos peptídeos hidrofóbicos de sete a oito aminoácidos, que são transportados de células doadoras

via componentes de membrana. A ligação destes ferormônios ocorre por proteínas receptoras específicas que em geral, são homologas aos peptídeos receptores nomeados OppA. Foi demonstrado que a proteína OppA é capaz de ligar o ferormônio mas, com menor afinidade que a proteína PrgZ (Detmers *et al.*, 2001). Uma ação mais ampla deste sistema de captação de peptídeos foi descrito em *Bacillus subtilis*, no qual se pôde observar uma verdadeira ação de “quorum-sensing” mediado por peptídeos, no qual a presença de ao menos um ortólogo ativo da proteína OppA é necessário para a indução dos estados de competência natural e esporulação (Rudner *et al.*, 1991; Solomon *et al.*, 2003).

A expressão de OppA também tem sido relatado por contribuir para a sensibilidade a peptídeos tóxicos e antibióticos aminoglicosídeos em cepas de *E. coli* e *S. typhimurium*. Além disso, vários estudos tem estabelecido um vínculo entre a expressão de características associadas à virulência, como as adesinas, e a expressão de OppA ortólogo funcional (Nepumoceno *et al.*, 2007).

Os trabalhos focados no gênero *Streptococcus* demonstram que o sistema Opp é amplamente encontrado em espécies patogênicas e não patogênicas e demonstram igual variabilidade de atuação do sistema Opp. Geralmente, neste gênero, os genes *opp* são organizados em um operon policistrônico com até três cópias do gene *oppA*, sugerindo que uma alta estequiometria do componente ligante é relevante tanto para o metabolismo quanto para a evolução desta espécie. Mutações que inativam o sistema Opp, parcialmente reduzem a aderência de *S. agalactiae* às células epiteliais, fibrinogênio e fibronectina, aparentemente devido ao controle da expressão de genes codificadores de adesinas (Samen *et al.*, 2004). Mutações nos genes *oppA*, *oppB*, *oppC* e *oppD* bloqueiam completamente a habilidade de captar oligopeptídeos, além disso mutações no gene *oppF* causa um defeito parcial no transporte (Solomon *et al.*, 2003). Foi demonstrado que OppA também modula a expressão de diversos genes associados à virulência em *S. pyogenes* (Wang *et al.*, 2005; Nepomuceno *et*

*al.*, 2007). Em conjunto estes achados sugerem que OppA, possui um papel duplo na fisiologia dos Estreptococos, afetando tanto o estilo de vida da espécie quanto a regulação de genes associados com a virulência pelo controle do sistema de captação de nutrientes e sensoriamento do micro-ambiente (Monnet, 2003).

Para aumentar a expressão do gene *oppA* e para tornar este mais independente, bactérias têm desenvolvido três estratégias que podem ser aplicadas simultaneamente na mesma espécie (Monnet, 2003). O primeiro é para conduzir de 2 a 5 cópias de genes *oppA* nos genomas. A bactéria ácido-láctica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* possuem 2 cópias de genes *oppA* (*oppA1* e *oppA2*) no mesmo operon com outros genes do sistema transportador. A segunda solução adotada por algumas bactérias é para conduzir a transcrição independente da OppA. Este é o caso da *Listeria monocytogenes*, onde um “stem-loop” estrutural tem sido encontrado entre OppA e outros genes do operon, conduzindo para a expressão predominante da OppA durante o crescimento em meio médio BHI a 37°C (Borezze *et al.*, 2000). A terceira solução, que é vista, por exemplo, em *Lactococcus lactis* linhagem MG1363 e em *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, apresentam um promotor específico para o gene *oppA* situado excepcionalmente no fim do operon Opp. Este promotor permite a transcrição destes dois genes (*oppA* e *pepO*) em *L. lactis* (Monnet, 2003).

Em um trabalho com a eubactéria *Vibrio fluvialis*, encontrada em água, indicou que o sistema Opp, em especial a proteína OppA, está diretamente relacionado a capacidade desta bactéria produzir biofilme. Defeitos na expressão da OppA resulta em um aumento na produção de biofilme, sugerindo um papel negativo para o sistema Opp na biogênese de biofilme (Lee *et al.*, 2004). A formação de biofilme requer a produção e secreção de polissacarídeos insolúveis derivados do metabolismo de carboidratos representando um passo importante na adesão à superfície celular (Nepomuceno *et al.*, 2007).

### 2.2.2.2 Regulação da expressão do gene *oppA*

A expressão de OppA é claramente modulada por fatores externos, especialmente componentes nitrogenados, mas o mecanismo de regulação não está bem esclarecido (Monnet, 2003).

Modificações no ambiente externo de bactérias estão geralmente associadas à mudanças na expressão do gene *oppA*. Em *E. coli*, a expressão da *oppA* é claramente reprimida em meio rico (LB) quando comparada com meio mínimo (M9 + Glicina) (Monnet, 2003).

A influência de aminoácidos na ativação ou repressão do gene *oppA* ocupa um lugar na via intracelular de aminoácidos e reguladores globais em ambas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em *E. coli* K12, leucinas exógenas aumentam o transporte de peptídeos via sistema Opp. Mais precisamente, leucina induz um aumento na síntese de OppA, conseqüentemente, aumentando a eficácia do transporte de peptídeos via sistema Opp em *E. coli* (Monnet, 2003; Hiron *et al.*, 2007).

Parâmetros físicos, como a temperatura é capaz de modular a expressão da OppA. Em *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* a transcrição do gene *oppA* é ativado em baixas temperaturas (5°C) e independentemente da resposta ao choque-frio. A expressão do operon *opp* em *E. coli* sob condições anaeróbicas aumenta a regulação (Hiron *et al.*, 2007).

### 2.3 Sistema de transporte de oligopeptídeos em *Aeromonas* spp

Até o momento, não existem referências a estudos diretos ou indiretos envolvendo o transporte de oligopeptídeos em *Aeromonas*. Entretanto, uma análise preliminar no genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 (loci 2911908-2906268), disponibilizado no GeneBank em 08/11/2006 (Seshadri et al., 2006) e *Aeromonas salmonicida* A449 (loci 1787488-1781793), disponibilizado no GeneBank em 17/04/2007 (Reith et al., Unpublished), permitiu identificar nestas posições seqüências com alta homologia com os genes *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF* de outras bactérias. Este operon apresenta a estrutura básica descrita para outras bactérias Gram-negativas. Além deste loci, uma varredura do genoma de *A. hydrophila*, permitiu identificar outras duas seqüências semelhantes ao gene *oppA*, assim como a presença de seqüências semelhantes aos genes *oppB*, *C*, *D* e *F* num operon associado ao transporte de dipeptídeos.

Portanto, o presente trabalho teve como principal objetivo, estudar o sistema de transporte de oligopeptídeos em *Aeromonas*. Desta forma, contribuir de forma significativa para o conhecimento mais aprofundado da fisiologia e patogenicidade das *Aeromonas* spp.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens de *Aeromonas* spp., apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição das linhagens de *Aeromonas* spp.: denominação, nome científico e origem.

| Denominação | Nome científico                      | Origem   |
|-------------|--------------------------------------|--|
| IB Aer 001  | <i>Aeromonas sobria</i>              | ATCC 43979 - *                                 |
| IB Aer 002  | <i>Aeromonas hydrophila</i>          | ATCC 7966 - *                                  |
| IB Aer 003  | <i>Aeromonas ichthiosmia</i>         | ATCC 49904 - *                                 |
| IB Aer 004  | <i>Aeromonas media</i>               | ATCC 33907 - *                                 |
| IB Aer 005  | <i>Aeromonas salmonicida</i>         | ATCC 33658 - *                                 |
| IB Aer 006  | <i>Aeromonas hydrophila punctata</i> | ATCC 14486 - *                                 |
| IB Aer 007  | <i>Aeromonas hydrophila</i>          | NCIB 9233 - *                                  |
| IB Aer 008  | <i>Aeromonas caviae</i>              | ATCC 15468 - *                                 |
| IB Aer 009  | <i>Aeromonas caviae</i>              | Instituto Osvaldo Cruz, sem código de origem.  |
| IB Aer 010  | <i>Aeromonas sobria</i>              | Instituto Osvaldo Cruz, sem código de origem.  |
| IB Aer 011  | <i>Aeromonas trota</i>               | ATCC 49657 - *                                 |
| IB Aer 012  | <i>Aeromonas hydrophila</i>          | CECT 839 - *                                   |
| IB Aer 013  | <i>Aeromonas hydrophila</i>          | CCT 191 - Adquirida do Instituto André Tosello |
| IB Aer 014  | <i>Aeromonas encheleia</i>           | CECT 4341 - *                                  |
| IB Aer 015  | <i>Aeromonas veronii</i>             | ATCC 35624 - *                                 |
| IB Aer 016  | <i>Aeromonas eucrenophila</i>        | ATCC 23309 - *                                 |
| IB Aer 017  | <i>Aeromonas allosaccharophila</i>   | ATCC 51208 - *                                 |

ATCC: American Type Culture Collection; NCIB: National Collection of Industrial Bacteria;

CECT: Collcción Española de Cultivos Tipo; CCT: Coleção de Culturas Tropical.

\* Cedida por Dr. Naharro - Universidad de León, Espanha



Estas linhagens são mantidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

As amostras de *Aeromonas* para este trabalho são mantidas em tubos de vidro com tampa de rosca, em meio de Lúria Bertani (LB) semi-sólido (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de cloreto de sódio; 1% de ágar; pH 7,2), mantidos em temperatura ambiente. São feitos repiques destas amostras em intervalos de 60 dias, para a renovação deste banco.

Os isolados utilizados para a execução dos testes, foram estriados e mantidos em placas de Petri, em meio de cultura Lúria Bertani (LB) sólido (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de cloreto de sódio; 1,5% de ágar; pH 7,2). A cada 15 dias, as amostras são repicadas e mantidas sobre refrigeração (4°C).

## **3.2 Análises Computacionais – Bioinformática**

### **3.2.1 Análise computacional para identificação dos componentes do sistema de transporte de oligopeptídeos - Opp**

As seqüências gênicas e protéicas foram obtidas após busca no banco de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e do KEGG ([www.genome.ad.jp/kegg](http://www.genome.ad.jp/kegg)) nos quais, as seguintes bactérias foram selecionadas para análise: *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 (Seshadri *et AL.*, 2006), *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 (Reith *et al.*, Unpublished), *Escherichia coli* K-12 MG1655 b1243 (Blattner *et al.*, 1997); *Escherichia coli*

O157:H7 str. Sakai (Makino *et al.*, 1999); *Shigella sonnei* Ss046; *Shigella dysenteriae* Sd197 (Yang *et al.*, 2005); *Salmonella typhimurium* LT2 STM1746.S (McClelland *et al.*, 2001); *Salmonella enterica* serovar *Typhi* CT18 STY1304 (Parkhill *et al.*, 2001); *Vibrio fluvialis* (Lee *et al.*, 2004); *Yersinia pestis* KIM y2026 (Deng *et al.*, 2002), através dos seguintes métodos computacionais:

- Comparação e procura de seqüências homólogas aos genes *opp*: Para identificação dos ortólogos dos genes do sistema Opp que apresentam maiores graus de similaridade foi utilizado o programa computacional BLAST-P disponível on-line no NCBI. Os resultados foram montados na forma de tabela com valores obtidos para os genes encontrados nas diferentes bactérias Gram-negativas.
- Identificação dos peptídeos sinais: A identificação dos peptídeos sinais de proteínas secretadas foi realizado através dos modelos de “neural networks” (NN) e de Markov (HMM) com o auxílio do programa computacional SignalP 3.0.
- Alinhamento de seqüências protéicas e de DNA: O alinhamento de seqüências protéicas foi realizado através do programa computacional ClustalX como auxiliar dentro dos programas BioEdit 7.0. e GeneDoc. Para tanto foi aplicado o sistema Blosum62 com modelos de Identidade e de Semelhança.
- Análise da estrutura tridimensional da OppA: Inicialmente, a análise da estrutura tridimensional das proteínas em estudo foi realizada utilizando as facilidades dos programas disponíveis do ambiente Expasy (Swiss-Prot).

### 3.3 Avaliação da presença do gene *oppA* em distintas espécies de *Aeromonas* spp

#### 3.3.1 Primers Utilizados

No presente trabalho, com vista à identificação da presença do gene *oppA* em *Aeromonas* spp., foram utilizadas as seqüências de *primers* descritas na Tabela 2. Os *primers* foram desenhados a partir das seqüências de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449 depositadas no NCBI, utilizando o programa BioEdit 7.0.

**Tabela 2.** Seqüência de *primers* utilizados para a avaliação do gene *oppA* em *Aeromonas*

| <i>Primers</i> | Seqüências (5'→3')   | Tamanho do Segmento Amplificado | Posição no gene <i>oppA</i> <sup>#</sup> |
|----------------|--|---------------------------------|--|
| OppA-5         | Forward GAT GTY CCC GCA GGT ACC AAA C<br>Reverse TCT TCA TCT GCT TGA AGC GCT C | 765 pb                          | 85 - 106<br>829 - 850                    |
| OppA-6         | Forward TGC GCA AAG ATG CCA AGT GGT C<br>Reverse TCT TCA TCT GCT TGA AGC GCT C | 542 pb                          | 308 - 329<br>829 - 850                   |
| OppA-7         | Forward CAA CAT GGT ATC CAA CGG TGC C<br>Reverse CTT CGT TGT AGT CGG CGA TCC A | 712 pb                          | 630 - 651<br>1321 - 1342                 |
| OppA-8         | Forward TGG CCT CCA TGT GGA AGA AGC T<br>Reverse GTA CAT GTC TTT GCT GTA GAG G | 400 pb                          | 1211 - 1232<br>1590 - 1611               |

<sup>#</sup> A posição dos *primers* no gene *oppA* foi baseada no genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A449.

#### 3.3.2 Amplificação do gene *oppA*

A amplificação dos segmentos correspondentes ao gene *oppA* associados ao transporte de oligopeptídeos de *Aeromonas* spp., foi realizada de acordo com o procedimento descrito a seguir.

As linhagens foram crescidas a 37°C/18horas em 5 ml de meio Lúria Bertani (LB) para a realização da PCR (Polymerase chain reaction). Após este período ressuspendeu-se o precipitado de células até a obtenção de uma solução homogênea. As amostras foram diluídas 1/20 em água Milli-Q autoclavada e utilizadas nas reações de PCR.

As reações de ampliações foram realizadas em volumes de 25µl contendo: 12,85µl de água Milli-Q autoclavada, 2,5µl de Buffer (Tris HCl - pH 8,3), 1µl de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de solução dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1µl de cada *primer*, 1,5µl de Triton-X-100, 0,15µl (5U/µl) de enzima TaqDNA polimerase High Fidelity (Invitrogen), e 4µl de suspensão bacteriana de cada uma das linhagens, obtidas de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

As ampliações foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC100, programado para 10 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de um minuto a 94°C para a desnaturação das fitas do DNA, um minuto a temperaturas que variaram de 56 a 64°C para anelamento de cada um dos pares de *primers* ao DNA, e dois minutos a 72°C para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 40 ciclos foi feita uma extensão suplementar por 10 minutos a 72°C e 10 minutos a 4°C.

Os protocolos básicos das reações de PCR e os programas seguiram protocolos padronizados.

### **3.3.2.1 Separação e visualização dos segmentos amplificados**

Os produtos de amplificação, acrescidos de 5µl de tampão de amostra (250mg de Azul de Bromofenol e 15g de Ficoll em 100ml de água destilada), foram submetidos à eletroforese (3V/cm), em géis horizontais de agarose 1,5% em tampão TBE (89mM Trisma,

89mM de Ácido Bórico e 8mM de EDTA), acrescidos de solução de Brometo de Etídio (10mg/ml). Como tampão de corrida utilizou-se também o TBE 1X. Os géis de agarose foram visualizados e fotografados sob transiluminador UV, após eletroforese na voltagem de 90V.

### **3.4 Extração de Proteínas Periplasmáticas**

Para extração de proteínas periplasmáticas foi seguida a metodologia modificada de Neru & Hepel (1965). As linhagens *A. hydrophila* ATCC 7966, *A. caviae* ATCC 15468, *A. sobria* ATCC 43979, *A. trota* ATCC 49657, *A. eucrenophila* ATCC 23309, *A. allosaccharophila* ATCC 51208, *A. media* ATCC 33907, *A. hydrophila* CCT 191, e *E. coli* ATCC 8739 foram inoculadas em 10ml de meio LB e cultivadas por 18hs. Após o cultivo as células foram coletadas por centrifugação a 10000 xg por 5 minutos, ressuspensas e, em seguida, foi acrescentados 20µl de clorofórmio e 200µl de Tris-HCl 10mM, após as células foram suspensas com o auxílio de um agitador elétrico até sua completa homogeneidade. O material foi então centrifugado a 10000 xg por 5min para posterior análise.

### **3.5 SDS-PAGE e imunodeteção**

A eletroforese de proteínas foi desenvolvida em gel descontínuo, formando por um gel concentrador contendo 4,5% de acrilamida e um gel separador contendo 12% de acrilamida. A corrida foi realizada com uma corrente constante de 60 volts no gel concentrador e 90 volts no gel separador. Quando o marcador (azul de bromofenol) atingiu a parte inferior do gel, o mesmo foi retirado e fixado em solução contendo metanol: ácido

acético: água (30: 7: 63) por 30 minutos. O gel foi corado por 18 horas com Coomassie Brilliant Blue R-250 (50mg/100 mL, dissolvidos na solução anterior. Após a coloração, realizaram-se várias lavagens com solução fixadora até obter-se boa definição das bandas.

Para identificação e determinação dos antígenos foi utilizada a técnica de “Western Blot”. As proteínas totais das linhagens analisadas foram preparadas e separadas de acordo com o método de Laemmli (1970), previamente descrito no item 3.5. Nestas avaliações, foi utilizado o sistema mini-V 8,10 (Gibco BRL), com géis de 7,5 cm por 10,25 cm.

Após a separação eletroforética, para a hibridização da membrana, foi seguida a metodologia modificada de Harlow & Lane (1988). O gel foi equilibrado por 15 minutos em 100 mL de tampão de transferência a 4°C (24,8 mM Trisma, 192 mM Glicina, 10% (v/v) metanol). Ao mesmo tempo, papéis filtro, membrana de nitrocelulose do tamanho do gel, e esponjas de contato, foram submersas no tampão de transferência por 15 minutos. Um sanduíche formado por: uma esponja, um papel filtro, o gel de eletroforese, a membrana de nitrocelulose, um papel filtro e outra esponja, foram colocados no suporte de transferência do aparelho. A cuba foi preenchida com tampão de transferência, e as proteínas transferidas para a membrana através de uma corrente tangencial de 150 volts por 2 horas.

Após a transferência, a membrana foi colocada em solução PBS por 5 minutos. Após foi bloqueada com 3% de soro albumina bovina (BSA) em tampão PBS por 2 horas, a temperatura ambiente. A mesma foi então lavada duas vezes durante 5 minutos com tampão PBS, e posteriormente incubadas durante 18 horas em 3% BSA em PBS contendo 1:500 de anti-corpo anti-OppA obtido de camundongos Balb/C com a proteína recombinante OppA de *Escherichia coli* K12. Após a incubação a membrana foi lavada quatro vezes por 5 minutos com tampão PBS, e incubadas por 1 hora em 3% BSA em PBS contendo 1µg/mL de imunoglobulina anti-camundongo conjugada com fosfatase alcalina. A membrana foi novamente lavada duas vezes por 5 minutos com PBS e uma vez com tampão Tris-HCl 50

mM (pH 7,5) contendo 150 mM de NaCl. Para coloração a membrana foi colocada em 10 mL de tampão para fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>), juntamente com 33 µL de NBT (nitro blue tetrazolium 50mg/mL) e 66 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato 50mg/mL). A membrana foi incubada durante 15 a 30 minutos, dependendo do aparecimento das bandas. Foi utilizado tampão de bloqueio contendo, 20 mM de EDTA em 20 mL de PBS.

### **3.6 Seqüenciamento do gene *oppA* de *Aeromonas***

O seqüenciamento foi realizado na Pontifícia Universidade Católica – PUC, de acordo com protocolo utilizado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociência – PUC.

#### **3.6.1 Purificação do produto de PCR**

A purificação foi realizada através de enzimas. As reações de purificação enzimática foram realizadas em volume final de 7µl contendo: 1µl de mix de purificação (3,3U de Exonuclease I (EXO I) – Amersham Biosciences + 0,66U de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) – Amersham Biosciences + água Milli-Q), mais 6µl de produto de PCR de cada amostra.

As purificações foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC100, programado para 30 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C.

#### **3.6.2 Preparação da reação de seqüenciamento**

Para o seqüenciamento, foram utilizadas as seguintes condições de reação de seqüenciamento: 30 a 50ng do produto de PCR purificado, 1µl de *primer* (0,25µM) e água Milli-Q para um volume final de 6µl. Posteriormente as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociência – PUC para análise, no aparelho MegaBACE1000 (GE Healthcare), utilizando kit para reação de seqüenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™)



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os organismos do gênero *Aeromonas* estão amplamente distribuídos no ambiente aquático e são reconhecidos por produzir doenças em diferentes espécies animais. Atualmente, o interesse por este patógeno, responsável por gastroenterites, bacteremia, e septicemia no homem, vem aumentando significativamente, uma vez que sua presença nas diferentes fontes de água e tipos de alimentos para o consumo pode representar um risco à saúde (Joseph & Carnahan 2000). Considerando que é um gênero cosmopolita, com capacidade adaptativa inusual a distintos ambientes, e grande quantidade de proteases extracelulares, julgou-se relevante pesquisar e caracterizar o sistema de transporte de oligopeptídeos, um transportador tipo ABC, em diferentes espécies de *Aeromonas*.

Os transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette), responsáveis pelo controle do tráfico de nutrientes essenciais e seus genes, correspondem a 5% dos genomas bacterianos. O sistema Opp, um dos transportadores ABC mais estudados, codifica uma proteína responsável pela ligação e translocação de peptídeos variando de 2 a 18 resíduos de aminoácidos. Além, do papel primário na captação de peptídeos, o sistema Opp, e particularmente, proteínas ortólogas a OppA, têm sido implicados em vários processos fisiológicos requeridos para sobrevivência em diferentes condições ambientais, incluindo formação de parede celular, comunicação inter-celular, esporulação, assim como

sobrevivência em baixas temperaturas ou ambientes intracelulares (Cundell *et al.*, 1995; Borezee *et al.*, 2000; Monnet, 2003; Balan *et al.*, 2008).

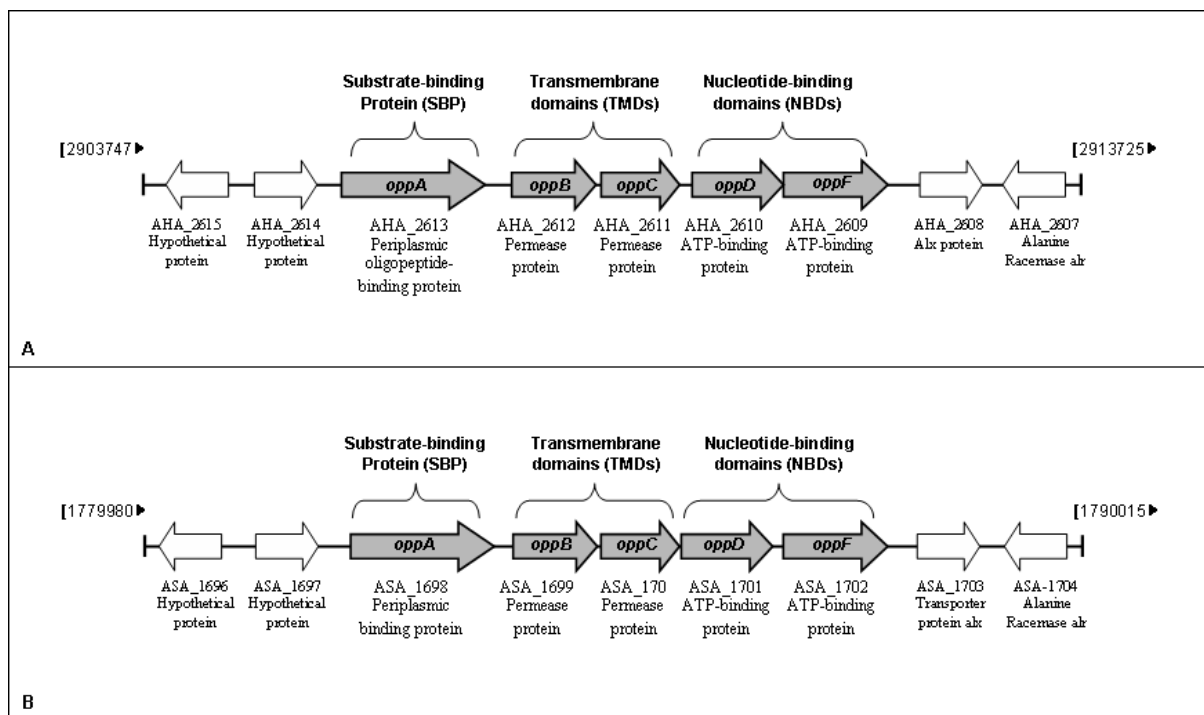
## **4.1 Análises Computacionais - bioinformática**

### **4.1.1 Análise comparativa das seqüências e organização genética do operon *opp* em *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, e outras espécies de bactérias Gram-negativas.**

Em uma primeira etapa do trabalho, foi avaliada a presença do operon *opp* nos genomas depositados de duas espécies de *Aeromonas* (*A. hydrophila* e *A. salmonicida*), a partir das seqüências disponíveis no National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A análise de Blast utilizando um padrão conhecido (*oppA* de *Escherichia coli* e de *Salmonella typhimurium*) revelou a presença de apenas uma cópia do gene *oppA* com a mesma organização genética para *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449.

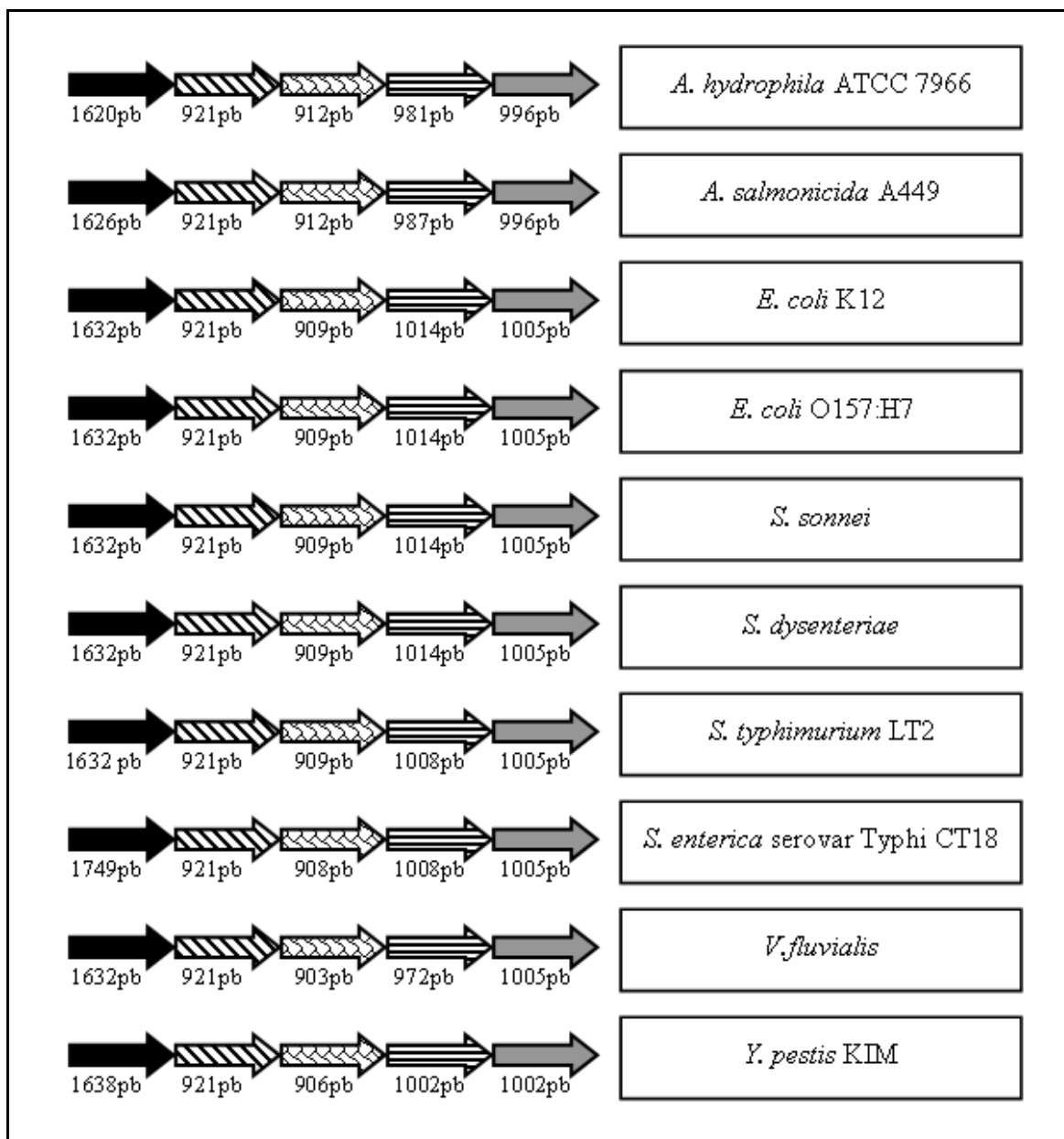
O operon *opp* encontrado nas duas espécies de *Aeromonas* é constituído por 5 genes (*oppA*, seguido pelos genes *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*). Entre esses componentes destaca-se o gene *oppA* que codifica a proteína OppA, responsável pela ligação aos substratos peptídicos no periplasma de bactérias Gram-negativas (Figura 4).



**Figura 4.** Organização genômica do sistema de transporte de oligopéptidos de *Aeromonas*. (A) *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (B) *Aeromonas salmonicida* A449.

A mesma organização genética foi encontrada nos operons *opp* presente em diferentes espécies de bactérias Gram-negativas, entre elas, duas linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli* K12 e *E. coli* O157:H7), duas espécies de *Shigella* (*S. sonnei* e *S. dysenteriae*), e duas espécies de *Salmonella* (*S. typhimurium* e *S. enterica* serovar Typhi), uma espécie de *Vibrio* (*V. fluvialis*) e uma espécie de *Yersinia* (*Y. pestis*), como pode ser observado na Figura 5.

A avaliação inicial do sistema Opp nas duas espécies de *Aeromonas* permitiu demonstrar que *A. hydrophila* e *A. salmonicida* possuem apenas um operon Opp constituído por cinco genes (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*) como foi demonstrado na Figura 4. Resultados semelhantes foram encontrados em genomas já sequenciados de diferentes bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae e Vibrionaceae (Figura 5).



**Figura 5.** Organização genética dos operons *opp* de diferentes bactérias Gram-negativas, a partir dos genomas disponíveis no NCBI

**Legenda:** Os cinco genes *opp* (*oppA*, *B*, *C*, *D* e *F*) estão representados por setas com diferentes preenchimentos, como indicado na figura. Os números de bases correspondentes às regiões estruturais de cada um dos genes *opp* estão indicados abaixo de cada seta. (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas salmonicida* A449, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai, *Shigella sonnei* Ss046, *Shigella dysenteriae* Sd197, *Salmonella typhimurium* LT2, *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, *Vibrio fluvialis*, e *Yersinia pestis* KIM)

Sistemas de transporte do tipo ABC em bactérias são constituídos por três componentes funcionais distintos. Tais componentes são em geral codificados por 5 genes sendo um gene dedicado à codificação da proteína de ligação ao substrato (gene *oppA*), dois

genes que codificam proteínas que irão formar o poro de membrana (genes *oppB* e *oppC*) e dois genes responsáveis pela codificação dos componentes ligadores de ATP (genes *oppD* e *oppF*) (Higgins *et al.*, 1983). Os cinco genes codificantes das cinco proteínas que formam o sistema de transporte de oligopeptídeos são sempre organizados em um operon policistrônico. É notável observar, que para realizar uma eficiente ligação de oligopeptídeos, a proteína OppA é essencial, para tanto, é produzida com estequiometria superior, quando comparada aos demais componentes do sistema Opp (Monnet, 2003). Uma particularidade interessante descrita para algumas espécies bacterianas, como *Streptococcus pneumoniae* e *S. thermophilus*, é a presença de múltiplas cópias do gene *oppA*, sugerindo que a alta estequiometria da proteína OppA contribui para a eficiência no reconhecimento de substratos oligopeptídicos e na adaptação em diferentes ambientes (Nepumoceno *et al.*, 2007). O aumento no número de cópias do gene e, conseqüentemente da proteína OppA, poderia aumentar a capacidade da bactéria em utilizar peptídeos transportados pelo sistema por meio de afinidades diferenciadas de cada um dos parólogos codificados.

No caso particular de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, encontramos outros genes associados ao transporte de peptídeos, conforme relacionado no quadro 1. Portanto, a análise das linhagens de *Aeromonas* já seqüenciadas apresenta múltiplas cópias de genes responsáveis pelo transporte de di- e oligopeptídeos, fato relativamente comum em outras bactérias Gram-negativas.

Cabe ressaltar que o gene originalmente descrito como *oppA* em *A. hydrophila* (gi117620824) corresponde a uma “soluble binding protein” e não ao gene *oppA*, o qual de acordo com os resultados obtidos neste trabalho encontra-se na posição 2910289-2911908, loco gi 117619267 (Quadro 1).

**Quadro 1.** Genes associados ao transporte de peptídeos em *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e *Aeromonas salmonicida* A449 #.

| Posição             | Gene             | Operon | Descrição  | Família      | Tamanho (aa) | Espécie               |
|---------------------|------------------|--------|--|--------------|--------------|-----------------------|
| 2200889<br>-2202505 | GI:<br>117620326 | A      | Periplasmic murein peptide-binding protein   | MppA         | 538          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 2805183<br>-2806814 | GI:<br>117618545 | ABCDE  | ABC transporter, periplasmic nickel/di-oligopeptide binding protein  | SBP          | 543          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 2910289<br>-2911908 | GI:<br>117619267 | ABCDF  | Oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein   | OppA         | 539          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 3198448<br>-3200211 | GI:<br>117617490 | A      | Periplasmic murein peptide-binding protein   | MppA         | 587          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 3209718<br>-3211568 | GI:<br>117617552 | A      | ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component  | SBP          | 616          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 3742581<br>-3744137 | GI:<br>117617900 | DABC   | Peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein   | SBP          | 518          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 3857061<br>-3858878 | GI:<br>117620824 | BCADF  | Oligopeptide-binding protein OppA  | OppA         | 605          | <i>A. hydrophila</i>  |
| 4090775<br>-4092379 | GI:<br>117617812 | A      | Periplasmic murein peptide-binding protein   | MppA         | 534          | <i>A. hydrophila</i>  |
| Posição             | Gene             | Operon | Descrição  | Família      | Tamanho (aa) | Espécie               |
| 1017996<br>-1019552 | GI:<br>145298025 | DABC   | Dipeptide transporte system periplasmic peptide-binding protein DppA   | DppA         | 518          | <i>A. salmonicida</i> |
| 1542973<br>-1544810 | GI:<br>145297124 | A      | Oligopeptide-binding protein OppA; frameshift due to 1bp deletion  | OppA         |              | <i>A. salmonicida</i> |
| 1549626<br>-1551278 | GI:<br>145298481 | A      | ABC-type oligopeptide transporter, periplasmic binding protein   | SBP          | 550          | <i>A. salmonicida</i> |
| 1781793<br>-1783418 | GI:<br>145298686 | ABCDF  | ABC-type oligopeptide transporter, periplasmic binding protein   | OppA         | 541          | <i>A. salmonicida</i> |
| 1875926<br>-1877533 | GI:<br>145298779 | ABCDE  | ABC-type nickel/dipeptide transporter, periplasmic component   | DppA/<br>SBP | 535          | <i>A. salmonicida</i> |
| 1987954<br>-1989570 | GI:<br>145298861 | A      | ABC-type oligopeptide transporter, periplasmic binding protein   | OppA         | 538          | <i>A. salmonicida</i> |
| 2830485<br>-2832040 | GI:<br>145297124 | DBCA   | ABC-type dipeptide/ oligopeptide/nickel transporter, periplasmic binding protein; frameshift due to 1bp deletion |              |              | <i>A. salmonicida</i> |
| 3916251<br>-3917855 | GI:<br>145300493 | A      | Periplasmic murein peptide-binding protein   | MppA         | 534          | <i>A. salmonicida</i> |
| 913889-<br>915706   | GI:<br>145297924 | BCADF  | ABC-type oligopeptide transporter system, periplasmic binding protein  | SBP/<br>AppA | 605          | <i>A. salmonicida</i> |

# Foi utilizado o programa computacional BLAST-P.

#### 4.1.2 Caracterização do operon *opp* de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966

*Aeromonas hydrophila* representa a espécie mais predominante dentro da família Aeromonadaceae, responsável por causar doenças em humanos, como gastroenterite, infecções de pele, e septicemia, sendo assim, é considerada a espécie mais patogênica ao homem (Janda & Abbott, 1998; Pillai *et al.*, 2006). *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 foi a primeira espécie do gênero *Aeromonas* a ser seqüenciada (Seshadri *et al.*, 2006), possibilitando dessa forma, análises ao genoma para diversas pesquisas, incluindo o estudo do sistema Opp.

O operon *opp* de *A. hydrophila* é formado por cinco genes estruturais (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*) que codificam componentes do sistema Opp, organizados na forma de um operon simples policistrônico codificando no total uma seqüência de 5430 pb (Figuras 4 e 5). Além destes, outros genes responsáveis pelo transporte de dipeptídeos (DppA) e de transporte de mureína com elevada homologia com a OppA encontram-se presentes no genoma de *Aeromonas*.

O primeiro cístron do operon *opp*, o gene *oppA*, codifica uma lipoproteína de 539 aminoácidos que apresenta uma massa molecular de 60,4 kDa correspondente a proteína de ligação ao substrato. A proteína OppA apresenta um peptídeo sinal de 25 resíduos de aminoácidos e um sítio de clivagem localizado entre Ala 25 e Ala 26. Os próximos dois genes do operon, *oppB* (921 pb) e *oppC* (912 pb), codificam uma proteína de 306 aminoácidos (33,6 kDa) e uma proteína de 303 aminoácidos (33,3 kDa), respectivamente, estas proteínas integrais definem o poro formado pelos domínios transmembranas. Os componentes de ligação ao ATP do sistema Opp de *A. hydrophila*, correspondem a uma proteína de 326 aminoácidos (36,1 kDa) e uma segunda proteína de 331 aminoácidos (36,5 kDa), codificando aos dois genes restantes, *oppD* (981 pb) e *oppF* (996 pb), respectivamente (Quadro 2).

**Quadro 2.** Aminoácidos (aa), massas moleculares (kDa), valores de identidade (%)/similariedade (%)# previstos entre os ortólogos protéicos do operon *opp* de diferentes bactérias Gram-negativas em relação as proteínas identificadas na linhagem de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

| <b>Bactérias Gram-negativas</b>               | <b>OppA</b> | <b>OppB</b> | <b>OppC</b> | <b>OppD</b> | <b>OppF</b> |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966          | 539aa       | 306aa       | 303aa       | 326aa       | 331aa       |
|   | 60,4kDa     | 33,6 kDa    | 33,3 kDa    | 36,1 kDa    | 36,5 kDa    |
|   | 100%/100%   | 100%/100%   | 100%/100%   | 100%/100%   | 100%/100%   |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> A449             | 541aa       | 306aa       | 303aa       | 328aa       | 331aa       |
|   | 60,9 kDa    | 33,3 kDa    | 33,3 kDa    | 36,5 kDa    | 36,4 kDa    |
|   | 90%/95%     | 97%/99%     | 98%/99%     | 97%/99%     | 97%/99%     |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655           | 543aa       | 306aa       | 302aa       | 337aa       | 334aa       |
|   | 60,8kDa     | 33,4kDa     | 33kDa       | 37,1kDa     | 37,1kDa     |
|   | 55%/71%     | 69%/84%     | 70%/86%     | 81%/87%     | 79%/89%     |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai    | 543aa       | 306 aa      | 302aa       | 337aa       | 334aa       |
|   | 61kDa       | 33,4kDa     | 33kDa       | 37,1kDa     | 37,1kDa     |
|   | 55%/71%     | 69%/84%     | 70%/86%     | 81%/87%     | 79%/89%     |
| <i>Shigella sonnei</i> Ss046                  | 543aa       | 306aa       | 302aa       | 337aa       | 334aa       |
|   | 61kDa       | 33,4kDa     | 33kDa       | 37,1kDa     | 37kDa       |
|   | 55%/71%     | 70%/84%     | 70%/86%     | 81%/87%     | 78%/89%     |
| <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197             | 543aa       | 306aa       | 302aa       | 337aa       | 334aa       |
|   | 61kDa       | 33,4kDa     | 33kDa       | 37,1kDa     | 37,1kDa     |
|   | 55%/71%     | 70%/84%     | 70%/86%     | 81%/87%     | 79%/89%     |
| <i>Salmonella typhimurium</i> LT2             | 543aa       | 306aa       | 302aa       | 335aa       | 334aa       |
|   | 61,2kDa     | 33,4kDa     | 33kDa       | 36,8kDa     | 37,2kDa     |
|   | 57%/74%     | 71%/84%     | 70%/86%     | 81%/88%     | 80%/89%     |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi CT18 | 582aa       | 306aa       | 302%        | 335aa       | 334aa       |
|   | 65,6kDa     | 33,4kDa     | 32,7kDa     | 36,8kDa     | 37,2kDa     |
|   | 57%/74%     | 71%/84%     | 70%/86%     | 81%/88%     | 80%/89%     |
| <i>Vibrio fluvialis</i>                       | 543aa       | 306aa       | 300aa       | 323aa       | 330aa       |
|   | 60,9kDa     | 33,6kDa     | 33,4kDa     | 36,1kDa     | 36,2kDa     |
|   | 60%/77%     | 72%/86%     | 76%/87%     | 85%/91%     | 79%/89%     |
| <i>Yersinia pestis</i> KIM                    | 545aa       | 306aa       | 301aa       | 333aa       | 333aa       |
|   | 61,6kDa     | 33,3kDa     | 33kDa       | 36,7kDa     | 36,9kDa     |
|   | 52%/68%     | 72%/84%     | 70%/87%     | 79%/87%     | 78%/87%     |

#. Foi utilizado o programa computacional BLAST-P.



#### **4.1.3 Análises das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA identificadas em *A. hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A449 e de diferentes bactérias Gram-negativas.**

A análise das seqüências de aminoácidos das proteínas Opp, gerada a partir das seqüências de nucleotídeos descritas nos genomas de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, revelou que as linhagens destas duas espécies de *Aeromonas* compartilham proteínas com o número de aminoácidos e massas moleculares muito semelhantes: *A. hydrophila* OppA (539 aa; 60,4 kDa), OppB (306 aa; 33,6 kDa), OppC (303 aa; 33,3 kDa), OppD (326 aa; 36,1 kDa) e OppF (331 aa; 36,4 kDa) e *A. salmonicida* OppA (541 aa; 60,9 kDa), OppB (306 aa; 33,3 kDa), OppC (303 aa; 33,3), OppD (328 aa; 36,5 kDa) e OppF (331 aa; 36,4 kDa). A determinação dos valores de identidade das proteínas Opp encontrados nas amostras das duas espécies de *Aeromonas*, obtidos por meio do programa BLAST-P, revelou valores que variam entre 90% a 98%. Análises semelhantes feitas em ortólogos encontrados nos genomas de diferentes bactérias Gram-negativas, revelaram valores de identidade mais baixos, particularmente para a proteína OppA (52 a 60% de identidade) quando comparados com as proteínas codificadas por *A. hydrophila*, como é possível observar no quadro 2.

Com base nestes resultados, foi realizada a comparação entre as seqüências dos aminoácidos da proteína OppA a partir da seqüência protéica depositada no NCBI de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, além de outras bactérias Gram-negativas, através do programa BACTIBASE database disponível online. A Tabela 3 descreve os aminoácidos classificados em: apolares, polares, ácidos e básicos.

A análise da seqüência de aminoácidos revelou que a proteína OppA de *A. hydrophila* ATCC 7966 consiste de 46,05% de aminoácidos apolares, 27,8% polares, 12,2%

ácidos e 13,95% básicos. Quando comparada com as demais bactérias Gram-negativas expostas na Tabela 3, todas apresentam semelhança quanto à classificação dos aminoácidos.

Cabe ressaltar ainda que, a proteína OppA de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* não apresentam o aminoácido cisteína, mas que, não devem causar mudanças significativas na conformação e na estrutura tridimensional na Opp nas *Aeromonas*.

**Tabela 3.** Descrição dos aminoácidos das proteínas OppA de *Aeromonas hydrophila* e *A. salmonicida* e de diferentes bactérias Gram-negativas<sup>#</sup>.

| Classificação | Spp <sup>#</sup> \<br>aa <sup>*</sup> | <i>A. hydrophila</i> <sup>1</sup> |       | <i>A. salmonicida</i> <sup>2</sup> |       | <i>E. coli</i> K12 <sup>3</sup> |       | <i>E. coli</i> O157 <sup>4</sup> |       | <i>S. sonnei</i> <sup>5</sup> |       | <i>S. dysenteriae</i> <sup>6</sup> |       | <i>S. typhimurium</i> <sup>7</sup> |       | <i>S. enterica</i> <sup>8</sup> |       | <i>V. fluvialis</i> <sup>9</sup> |       | <i>Y. pestis</i> <sup>10</sup> |       |
|---------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------|------------------------------------|-------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|-------------------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
|               |                                       | N                                 | %     | N                                  | %     | N                               | %     | N                                | %     | N                             | %     | N                                  | %     | N                                  | %     | N                               | %     | N                                | %     | N                              | %     |
| Apolares      | Ala                                   | 50                                | 9,3%  | 42                                 | 7,8%  | 46                              | 8,26% | 46                               | 8,26% | 46                            | 8,26% | 46                                 | 8,26% | 48                                 | 8,62% | 49                              | 8,19% | 53                               | 9,52% | 42                             | 9,52% |
|               | Phe                                   | 19                                | 3,5%  | 17                                 | 3,15% | 12                              | 2,15% | 12                               | 2,15% | 12                            | 2,15% | 12                                 | 2,15% | 16                                 | 2,87% | 17                              | 2,84% | 16                               | 2,87% | 15                             | 2,87% |
|               | Gly                                   | 33                                | 6,1%  | 34                                 | 6,3%  | 29                              | 5,21% | 29                               | 5,21% | 28                            | 5,08% | 29                                 | 5,21% | 23                                 | 4,13% | 25                              | 4,18% | 31                               | 5,57% | 24                             | 5,57% |
|               | Ile                                   | 18                                | 3,4%  | 19                                 | 3,5%  | 25                              | 4,49% | 25                               | 4,49% | 25                            | 4,49% | 25                                 | 4,49% | 27                                 | 4,85% | 28                              | 4,68% | 25                               | 4,59% | 27                             | 4,59% |
|               | Leu                                   | 39                                | 7,2%  | 39                                 | 7,2%  | 45                              | 8,08% | 45                               | 8,08% | 45                            | 8,08% | 45                                 | 8,08% | 47                                 | 8,44% | 50                              | 8,36% | 42                               | 7,54% | 46                             | 7,54% |
|               | Pro                                   | 29                                | 5,4%  | 30                                 | 5,5%  | 32                              | 5,75% | 32                               | 5,75% | 32                            | 5,75% | 31                                 | 5,57% | 31                                 | 5,57% | 31                              | 5,57% | 24                               | 4,31% | 31                             | 4,31% |
|               | Val                                   | 50                                | 9,3%  | 48                                 | 8,9%  | 44                              | 7,9%  | 44                               | 7,9%  | 44                            | 7,9%  | 44                                 | 7,9%  | 44                                 | 7,9%  | 49                              | 8,19% | 36                               | 6,46% | 43                             | 6,46% |
| Trp           | 10                                    | 1,85%                             | 10    | 1,85%                              | 13    | 2,33%                           | 13    | 2,33%                            | 13    | 2,33%                         | 13    | 2,33%                              | 13    | 2,33%                              | 14    | 2,34%                           | 10    | 1,80%                            | 12    | 1,80%                          |       |
| Polares       | Cys                                   | 0                                 | 0     | 0                                  | 0     | 2                               | 0,36% | 2                                | 0,36% | 2                             | 0,36% | 2                                  | 0,36% | 2                                  | 0,36% | 4                               | 0,67% | 2                                | 0,36% | 2                              | 0,36% |
|               | Met                                   | 15                                | 2,8%  | 18                                 | 3,3%  | 10                              | 1,8%  | 10                               | 1,8%  | 10                            | 1,8%  | 10                                 | 1,8%  | 4                                  | 0,72% | 5                               | 0,84% | 14                               | 2,51% | 11                             | 2,51% |
|               | Asn                                   | 33                                | 6,1%  | 28                                 | 5,2%  | 33                              | 5,92% | 33                               | 5,92% | 33                            | 5,92% | 33                                 | 5,92% | 37                                 | 6,64% | 41                              | 6,86% | 35                               | 6,28% | 38                             | 6,28% |
|               | Gln                                   | 17                                | 3,15% | 17                                 | 3,15% | 17                              | 3,05% | 17                               | 3,05% | 17                            | 3,05% | 17                                 | 3,05% | 18                                 | 3,23% | 19                              | 3,18% | 20                               | 3,59% | 20                             | 3,59% |
|               | Ser                                   | 24                                | 4,45% | 26                                 | 4,8%  | 29                              | 5,21% | 29                               | 5,21% | 30                            | 5,39% | 30                                 | 5,39% | 31                                 | 5,57% | 33                              | 5,52% | 27                               | 4,85% | 32                             | 4,85% |
|               | Thr                                   | 33                                | 6,1%  | 36                                 | 6,65% | 41                              | 7,36% | 41                               | 7,36% | 41                            | 7,36% | 40                                 | 7,18% | 33                                 | 5,92% | 39                              | 6,52% | 40                               | 7,18% | 35                             | 7,18% |
|               | Tyr                                   | 28                                | 5,2%  | 30                                 | 5,5%  | 29                              | 5,21% | 29                               | 5,21% | 29                            | 5,21% | 29                                 | 5,21% | 28                                 | 5,03% | 29                              | 4,85% | 26                               | 4,67% | 27                             | 4,67% |
| Ácidos        | Asp                                   | 35                                | 6,5%  | 41                                 | 7,6%  | 36                              | 6,46% | 36                               | 6,46% | 36                            | 6,46% | 36                                 | 6,46% | 39                                 | 7,0%  | 41                              | 6,86% | 31                               | 5,57% | 39                             | 5,57% |
|               | Glu                                   | 31                                | 5,7%  | 31                                 | 5,7%  | 30                              | 5,39% | 30                               | 5,39% | 30                            | 5,39% | 30                                 | 5,39% | 29                                 | 5,21% | 29                              | 4,85% | 39                               | 7,00% | 30                             | 7,00% |
| Básicos       | His                                   | 10                                | 1,85% | 8                                  | 1,5%  | 11                              | 1,97% | 11                               | 1,97% | 11                            | 1,97% | 11                                 | 1,97% | 11                                 | 1,97% | 13                              | 2,17% | 11                               | 1,97% | 9                              | 1,97% |
|               | Lys                                   | 50                                | 9,3%  | 50                                 | 9,25% | 41                              | 7,36% | 41                               | 7,36% | 41                            | 7,36% | 41                                 | 7,36% | 45                                 | 8,08% | 48                              | 8,03% | 42                               | 7,54% | 46                             | 7,54% |
|               | Arg                                   | 15                                | 2,8%  | 17                                 | 3,15% | 18                              | 3,23% | 18                               | 3,23% | 18                            | 3,23% | 19                                 | 3,41% | 17                                 | 3,05% | 18                              | 3,01% | 19                               | 3,41% | 16                             | 3,41% |

<sup>#</sup>espécies; <sup>\*</sup>aminoácidos; <sup>1</sup>*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966; <sup>2</sup>*Aeromonas salmonicida* A449; <sup>3</sup>*Escherichia coli* K12; <sup>4</sup>*Escherichia coli* O157; <sup>5</sup>*Shigella sonnei* Sn046;

<sup>6</sup>*Shigella dysenteriae* Sd197; <sup>7</sup>*Salmonella typhimurium* LT2; <sup>8</sup>*Salmonella enterica* serovar Typhi CT18; <sup>9</sup>*Vibrio fluvialis*; <sup>10</sup>*Yersinia pestis* KIM.

<sup>\*</sup><http://www.cck.rnu.tn/pfba/bactibase/analyzesequence.php>.

#### 4.1.4 Alinhamento das seqüências protéicas OppA de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*

Para a análise de similitude das proteínas OppA expressas pelas espécies *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449 foi realizado primeiramente o alinhamento das seqüências correspondentes ao gene estrutural. O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA nos mostrou alto grau de identidade, como demonstrado no quadro 3.

**Quadro 3.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína OppA de *A. hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A449#.

|  |  |       |
|--|--|-------|
| A. hyd. ATCC7966   | --MTHKKTMINTELLVAALFGGVNAAQAADVPAAGTKLADVQQLVKGNSEPATLDPHKTEGTVESNILRDLFEGLVASGPK    | : 78  |
| A. sal. A449   | MEMTHKKTMINTELLVAALFGGMNAAQAADVPAAGTKLSDVQQLVKGNSEPATLDPHKTEGTVESNILRDLFEGLVSSGPK    | : 80  |
| MTHKKTMINTELLVAALFGG6NAA AADVPAAGTKL DVQQLVKGNSEPATLDPHKTEGTVESNILRDLFEGLV SGPK    |  |       |
| A. hyd. ATCC7966   | GEVLP6AESAWEKTKDNKHFVFLRKRDAKWSNGDPVTAHDFEFAPKRAVDPKTASPYSWYLEIPTIVNASEI IAGKKAADT   | : 158 |
| A. sal. A449   | GEVLP6VAESWETKDNKHFVFLRKRDAKWSNGDPVTAHDFEFAPKRAVDPKTASPYAWYMEIPTIVNATEI IAGKKAADT    | : 160 |
| GEVLP 6AESWETKDNK FVFLRKRDAKWSNGDPVTAHDFEFAPKRAVDPKT SPY WY6EIPTIVNA3EIIAGKK DT    |  |       |
| A. hyd. ATCC7966   | LGVKAVDDYTTFEVQLEKAVPYFVSMLSHTTTYPVPPKVKIEKFGDKWTQPGNMVSNNGAYV LKDWVNERVDVERNE NYWNN | : 238 |
| A. sal. A449   | LGVKAVDDYTTFEVQLEKAI PYFVSMLSHTTTYPVPPKVKIEKFGDKWTQPGNMVSNNGAYQLKDWVNERVDIERNE KYWGN | : 240 |
| LGVKAVDDYTTFEVQLEKA6PYFVSMLSHTTTYPVPPKVKIEKFGDKWTQPGNMVSNNGAY LKDWVNERVD6ERNP YW N |  |       |
| A. hyd. ATCC7966   | AKTVINKVTYLPIQSTNAELNRYLAGEVDLTYNMPIERFKQMKKELPNEVKVSGYVGTYYYQYNEFKHKPFDDVVRVRTALS   | : 318 |
| A. sal. A449   | AKTVIDKVSYLPPIQSTNAELNRYLAGELDLTYNMPIERFKQMKKDL PNEVKVSGYVGTYYYTFNFKRKPYPDDVVRVRTAL  | : 320 |
| AKTVI1KV3YLPPIQSTNAELNRYLAGE6DLTYNMPIERFKQMKK LPNEVKVSGYVGTYYY 5N K KP5DDVVRVRTAL3 |  |       |
| A. hyd. ATCC7966   | YAI DRNVIADKVMGKGETPGYTLVPDFVDGFKPVAPAWSKLTAERDAKAKELITEAGFGPGKPLKFELLYNTDDNHKKV     | : 398 |
| A. sal. A449   | YAI DRDVIADKVMGKGETPGYALVPDFVDGFKPVAPAWSKLTAERDTKAKAMIQEAGYGPDPNPLKFELLYNTDDNHKKV    | : 400 |
| YAI DR1VIADKVMGKGETPGY LVPDFVDGFKPVAP WSKLTAERD KAK 6L EAG5GP PLKFELLYNTDDNHKKV    |  |       |
| A. hyd. ATCC7966   | AVAVASMWKKLGVQVSLVNQEWKTYLET KQGGQFDVGRAGWIADYNEASSMLDLMQTTHGNNDGKYSNPAFDKLMNESRN    | : 478 |
| A. sal. A449   | AVAVASMWKKLGVQVSLVNQEWKTYLET LKQGGQFDVARGWIADYNEASSMLDLMQTTHGNNDGKYSNPAFDKLMDESRI    | : 480 |
| AVAVASMWKKLGVQVSLVNQEWKTYLET KQGGQFDV R GWIADYNEASSMLDLMQTTHGNNDGKYSNP FDKLM1ESRI  |  |       |
| A. hyd. ATCC7966   | QVDADARNKLYVQAEELIKDMPAPIYQYVTSRMVKS YVGGYPANPLDNLYSKDMYIIAH--                       | : 539 |
| A. sal. A449   | QVDASARNKLYVQAEELITKDMPIAPIYQYVTSRMVKS YVGGYPANPLDNLYSKDMYIVAH--                     | : 541 |
| QVD RNKLYVQAEELI KDMPIAPIYQYVTSRMVKS YVGGYPANPLDNLYSKDMYI 6AH                      |  |       |

#. Em vermelho as seqüências com 100% de identidade.

Conforme pode ser observado no alinhamento da seqüência de OppA, há um erro de anotação na OppA de *A. salmonicida* que lhe confere dois aminoácidos a mais. Por outro

lado, apenas 31/539 trocas de aminoácidos foram identificadas, o que considerando que se trata de duas espécies filogeneticamente afastadas (Martínez-Murcia, 1999; Yañez *et al.*, 2003; Martínez-Murcia *et al.*, 2007) indica alta conservação desta proteína dentro do gênero *Aeromonas*.

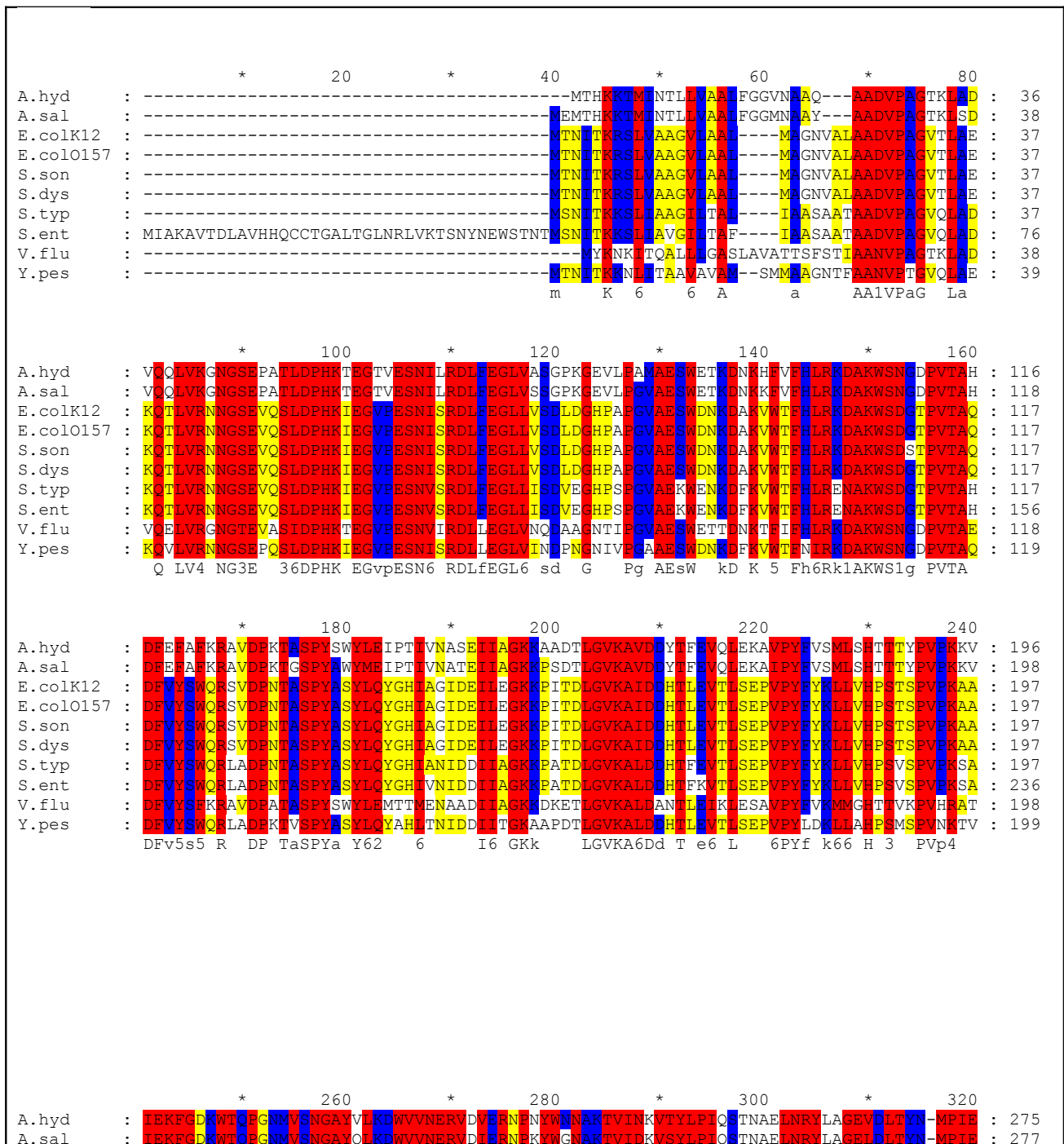
As proteínas secretadas devem apresentar um peptídeo sinal, retirado pela peptidase durante o processo de transporte através da membrana. Assim sendo, as sequências das proteínas OppAs de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* foram avaliadas quando à presença de peptídeo sinal através do programa SignalP V. 2.0. Os resultados desta análise mostrou um sítio de corte nos resíduos 25 e 27 das OppAs de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, respectivamente. Ambos os sítios correspondem a sequências AQA/AD. Desta forma as proteínas de ligação periplasmática apresenta de ambas bactérias apresentam 514 resíduos de aminoácidos.

#### **4.1.5 Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA de *Aeromonas* e de diferentes bactérias Gram-negativas.**

Visando avaliar o grau de similariedade das proteínas OppA expressas pelas espécies de *Aeromonas* (*A. hydrophila* e *A. salmonicida*), e de diferentes bactérias Gram-negativas (*A. hydrophila* ATCC 7966, *A. salmonicida* A449, *E. coli* K12, *E. coli* O157, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. typhimurium*, *S. enterica*, *V. fluvialis*, e *Y. pestis*), realizamos o alinhamento das seqüências de aminoácidos obtidas a partir dos genomas das respectivas bactérias disponíveis no NCBI. Os aminoácidos alinhados foram marcados com diferentes cores de acordo com o grau de identidade apresentados entre as seqüências estudadas. Todas as seqüências foram editadas com o programa GeneDoc após o alinhamento obtido com o

programa BioEdit. A numeração à direita de cada seqüência refere-se ao número do último aminoácido representado em cada linha (Quadro 4).

**Quadro 4.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas OppA de diferentes bactérias Gram-negativas, comparadas com a seqüências de *A. hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A449#.



|   |   |  |   |     |
|---|---|--|---|-----|
| E.colK12  | : | IEKFG <b>E</b> KWT <b>Q</b> PGNI <b>V</b> NGAY <b>T</b> LKDWV <b>V</b> NERI <b>V</b> LER <b>S</b> ET <b>Y</b> W <b>N</b> AK <b>T</b> VIN <b>Q</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> A <b>S</b> E <b>V</b> T <b>D</b> V <b>N</b> R <b>Y</b> R <b>S</b> G <b>E</b> I <b>D</b> M <b>T</b> Y <b>N</b> N <b>M</b> P <b>I</b> E   | : | 277 |
| E.colO157   | : | IEKFG <b>E</b> KWT <b>Q</b> PGNI <b>V</b> NGAY <b>T</b> LKDWV <b>V</b> NERI <b>V</b> LER <b>S</b> ET <b>Y</b> W <b>N</b> AK <b>T</b> VIN <b>Q</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> A <b>S</b> E <b>V</b> T <b>D</b> V <b>N</b> R <b>Y</b> R <b>S</b> G <b>E</b> I <b>D</b> M <b>T</b> Y <b>N</b> N <b>M</b> P <b>I</b> E   | : | 277 |
| S.son   | : | IEKFG <b>E</b> KWT <b>Q</b> PGNI <b>V</b> NGAY <b>T</b> LKDWV <b>V</b> NERI <b>V</b> LER <b>S</b> ET <b>Y</b> W <b>N</b> AK <b>T</b> VIN <b>Q</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> A <b>S</b> E <b>V</b> T <b>D</b> V <b>N</b> R <b>Y</b> R <b>S</b> G <b>E</b> I <b>D</b> M <b>T</b> Y <b>N</b> N <b>M</b> P <b>I</b> E   | : | 277 |
| S.dys   | : | IEKFG <b>E</b> KWT <b>Q</b> PGNI <b>V</b> NGAY <b>T</b> LKDWV <b>V</b> NERI <b>V</b> LER <b>S</b> ET <b>Y</b> W <b>N</b> AK <b>T</b> VIN <b>Q</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> A <b>S</b> E <b>V</b> T <b>D</b> V <b>N</b> R <b>Y</b> R <b>S</b> G <b>E</b> I <b>D</b> M <b>T</b> Y <b>N</b> N <b>M</b> P <b>I</b> E   | : | 277 |
| S.typ   | : | VEKFG <b>D</b> KWT <b>Q</b> PAN <b>I</b> V <b>T</b> NGAY <b>K</b> LKNW <b>V</b> NERI <b>V</b> LER <b>N</b> P <b>Q</b> Y <b>W</b> DN <b>A</b> K <b>T</b> VIN <b>Q</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> S <b>E</b> V <b>T</b> D <b>V</b> N <b>R</b> Y <b>R</b> S <b>G</b> E <b>I</b> D <b>M</b> T <b>Y</b> N <b>N</b> M <b>P</b> I <b>E</b>  | : | 277 |
| S.ent   | : | VEKFG <b>D</b> KWT <b>Q</b> PAN <b>I</b> V <b>T</b> NGAY <b>K</b> LKNW <b>V</b> NERI <b>V</b> LER <b>N</b> P <b>Q</b> Y <b>W</b> DN <b>D</b> K <b>T</b> VIN <b>Q</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> S <b>E</b> V <b>T</b> D <b>V</b> N <b>R</b> Y <b>R</b> S <b>G</b> E <b>I</b> D <b>M</b> T <b>Y</b> N <b>N</b> M <b>P</b> I <b>E</b>  | : | 316 |
| V.flu   | : | VEK <b>W</b> G <b>D</b> Q <b>W</b> T <b>K</b> P <b>D</b> H <b>F</b> V <b>G</b> NGAY <b>V</b> L <b>D</b> K <b>W</b> V <b>V</b> NER <b>M</b> E <b>L</b> K <b>N</b> P <b>N</b> Y <b>W</b> DN <b>E</b> H <b>T</b> V <b>I</b> N <b>K</b> V <b>T</b> Y <b>L</b> P <b>I</b> E <b>N</b> Q <b>V</b> A <b>E</b> M <b>N</b> R <b>F</b> L <b>S</b> G <b>E</b> I <b>Q</b> I <b>T</b> N <b>E</b> - <b>L</b> P <b>L</b> E                                   | : | 277 |
| Y.pes   | : | VEK <b>F</b> G <b>E</b> K <b>W</b> T <b>Q</b> P <b>N</b> V <b>NG</b> AY <b>L</b> k <b>W</b> 6 <b>V</b> NER <b>6</b> 6 <b>e</b> r <b>P</b> Y <b>W</b> Nak <b>T</b> V <b>I</b> 1 <b>V</b> 3 <b>Y</b> L <b>P</b> I <b>s</b> v <b>6</b> N <b>R</b> 5 <b>s</b> G <b>E</b> 6 <b>d</b> 6 <b>T</b> yn <b>6</b> P <b>6</b> E  | : | 279 |
| 6EK5G kWTqP n V NGAY Lk W6VNER6 6er P YW NaktVI1 V3YLPI s v 6NR5 sGE6d6Tyn 6P6E |   |  |   |     |
|   |   |  |   |     |
| A.hyd   | : | RFK <b>K</b> MK <b>K</b> EL <b>S</b> NE <b>V</b> K <b>S</b> GY <b>G</b> TY <b>Y</b> Y <b>F</b> Y <b>N</b> F <b>K</b> H <b>K</b> P <b>F</b> D <b>V</b> R <b>V</b> R <b>T</b> A <b>L</b> S <b>Y</b> A <b>I</b> D <b>R</b> N <b>V</b> I <b>A</b> D <b>K</b> V <b>M</b> G <b>K</b> G <b>E</b> T <b>G</b> Y <b>T</b> L <b>V</b> E <b>D</b> V <b>G</b> F <b>P</b> V <b>A</b> E <b>A</b>  | : | 355 |
| A.sal   | : | RFK <b>K</b> MK <b>K</b> D <b>L</b> SNE <b>V</b> K <b>S</b> GY <b>G</b> TY <b>Y</b> Y <b>F</b> T <b>F</b> N <b>T</b> K <b>K</b> P <b>Y</b> D <b>V</b> R <b>V</b> R <b>T</b> A <b>L</b> T <b>Y</b> A <b>I</b> D <b>R</b> D <b>V</b> I <b>A</b> D <b>K</b> V <b>M</b> G <b>K</b> G <b>E</b> T <b>G</b> Y <b>A</b> L <b>V</b> E <b>D</b> V <b>G</b> F <b>P</b> V <b>A</b> P <b>E</b>  | : | 357 |
| E.colK12  | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> DE <b>V</b> H <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>F</b> I <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>F</b> F <b>N</b> D <b>V</b> R <b>V</b> R <b>T</b> A <b>L</b> K <b>L</b> G <b>M</b> D <b>R</b> D <b>I</b> I <b>V</b> N <b>K</b> V <b>K</b> A <b>G</b> D <b>M</b> P <b>A</b> Y <b>G</b> Y <b>F</b> P <b>Y</b> T <b>D</b> G <b>A</b> K <b>L</b> T <b>Q</b> P <b>E</b>                    | : | 357 |
| E.colO157   | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> DE <b>V</b> H <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>F</b> I <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>F</b> F <b>N</b> D <b>V</b> R <b>V</b> R <b>T</b> A <b>L</b> K <b>L</b> G <b>M</b> D <b>R</b> D <b>I</b> I <b>V</b> N <b>K</b> V <b>K</b> A <b>G</b> D <b>M</b> P <b>A</b> Y <b>G</b> Y <b>F</b> P <b>Y</b> T <b>D</b> G <b>A</b> K <b>L</b> T <b>Q</b> P <b>E</b>                    | : | 357 |
| S.son   | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> DE <b>V</b> H <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>F</b> I <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>F</b> F <b>N</b> D <b>V</b> R <b>V</b> R <b>T</b> A <b>L</b> K <b>L</b> G <b>M</b> D <b>R</b> D <b>I</b> I <b>V</b> N <b>K</b> V <b>K</b> A <b>G</b> D <b>M</b> S <b>A</b> Y <b>G</b> Y <b>F</b> P <b>Y</b> T <b>D</b> G <b>A</b> K <b>L</b> T <b>Q</b> P <b>E</b>                    | : | 357 |
| S.dys   | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> DE <b>V</b> H <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>F</b> I <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>F</b> F <b>N</b> D <b>V</b> R <b>V</b> R <b>T</b> A <b>L</b> K <b>L</b> G <b>M</b> D <b>R</b> D <b>I</b> I <b>V</b> N <b>K</b> V <b>K</b> A <b>G</b> D <b>M</b> S <b>A</b> Y <b>G</b> Y <b>F</b> P <b>Y</b> T <b>D</b> G <b>A</b> K <b>L</b> T <b>Q</b> P <b>E</b>                    | : | 357 |
| S.typ   | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> NE <b>V</b> R <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>F</b> I <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>A</b> F <b>F</b> N <b>D</b> V <b>R</b> V <b>R</b> T <b>A</b> L <b>K</b> L <b>A</b> L <b>D</b> R <b>D</b> I <b>I</b> V <b>N</b> K <b>V</b> K <b>N</b> G <b>D</b> L <b>P</b> A <b>S</b> Y <b>S</b> F <b>P</b> Y <b>T</b> D <b>G</b> A <b>K</b> L <b>V</b> E <b>P</b> E                  | : | 357 |
| S.ent   | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> NE <b>V</b> R <b>V</b> D <b>P</b> Y <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>F</b> I <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>A</b> F <b>F</b> N <b>D</b> V <b>R</b> V <b>R</b> T <b>A</b> L <b>K</b> L <b>A</b> L <b>D</b> R <b>D</b> I <b>I</b> V <b>N</b> K <b>V</b> K <b>N</b> G <b>D</b> L <b>P</b> A <b>S</b> Y <b>S</b> F <b>P</b> Y <b>T</b> D <b>G</b> A <b>K</b> L <b>V</b> E <b>P</b> E                  | : | 396 |
| V.flu   | : | H <b>F</b> K <b>L</b> Q <b>K</b> E <b>H</b> E <b>S</b> V <b>Q</b> Q <b>G</b> N <b>L</b> C <b>T</b> Y <b>Y</b> Y <b>G</b> F <b>N</b> N <b>Q</b> P <b>A</b> F <b>F</b> N <b>D</b> V <b>R</b> I <b>R</b> K <b>A</b> L <b>S</b> Y <b>A</b> I <b>D</b> R <b>N</b> I <b>T</b> D <b>A</b> L <b>L</b> G <b>Q</b> Q <b>K</b> P <b>A</b> F <b>L</b> E <b>I</b> A <b>G</b> F <b>H</b> P <b>E</b> M <b>P</b> A   | : | 357 |
| Y.pes   | : | LFQ <b>K</b> L <b>K</b> K <b>E</b> T <b>P</b> D <b>Q</b> V <b>H</b> V <b>D</b> P <b>Y</b> L <b>C</b> T <b>Y</b> Y <b>Y</b> F <b>I</b> N <b>N</b> Q <b>P</b> A <b>F</b> F <b>T</b> A <b>R</b> V <b>R</b> E <b>A</b> L <b>K</b> L <b>G</b> M <b>D</b> R <b>D</b> I <b>I</b> V <b>N</b> K <b>V</b> K <b>N</b> G <b>D</b> L <b>P</b> A <b>Y</b> G <b>F</b> F <b>P</b> Y <b>T</b> S <b>G</b> A <b>E</b> L <b>L</b> T <b>P</b> E                   | : | 359 |
| F 6kKe P V V y6cTYYY Nnq P5 DvR6rTAL 6DR16I 1k6 qG paY tP tdG k Pe              |   |  |   |     |
|   |   |  |   |     |
| A.hyd   | : | W <b>S</b> K <b>L</b> T <b>Q</b> A <b>E</b> R <b>T</b> K <b>A</b> K <b>A</b> E <b>L</b> L <b>T</b> E <b>A</b> G <b>F</b> G <b>P</b> K <b>E</b> L <b>F</b> E <b>L</b> L <b>T</b> N <b>D</b> D <b>N</b> H <b>K</b> K <b>V</b> A <b>V</b> A <b>S</b> M <b>W</b> K <b>K</b> - <b>L</b> G <b>V</b> Q <b>V</b> S <b>L</b> V <b>N</b> Q <b>E</b> W <b>K</b> T <b>Y</b> L <b>E</b> T <b>K</b> Q <b>Q</b> G <b>F</b> D <b>V</b>                       | : | 434 |
| A.sal   | : | W <b>S</b> K <b>L</b> T <b>Q</b> A <b>E</b> R <b>T</b> K <b>A</b> K <b>A</b> M <b>L</b> Q <b>E</b> A <b>G</b> Y <b>G</b> P <b>N</b> P <b>L</b> K <b>F</b> E <b>L</b> L <b>T</b> N <b>D</b> D <b>N</b> H <b>K</b> K <b>V</b> A <b>V</b> A <b>S</b> M <b>W</b> K <b>K</b> - <b>L</b> G <b>V</b> Q <b>V</b> S <b>L</b> V <b>N</b> Q <b>E</b> W <b>K</b> T <b>Y</b> L <b>E</b> T <b>L</b> K <b>Q</b> Q <b>G</b> F <b>D</b> V                     | : | 436 |
| E.colK12  | : | W <b>F</b> G <b>W</b> S <b>Q</b> E <b>K</b> R <b>N</b> E <b>E</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> Y <b>T</b> A <b>K</b> P <b>L</b> T <b>I</b> N <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> A <b>S</b> S <b>L</b> W <b>K</b> K <b>N</b> I <b>G</b> V <b>N</b> V <b>K</b> L <b>V</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> T <b>F</b> D <b>V</b> | : | 437 |
| E.colO157   | : | W <b>F</b> G <b>W</b> S <b>Q</b> E <b>K</b> R <b>N</b> E <b>E</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> Y <b>T</b> A <b>K</b> P <b>L</b> T <b>I</b> N <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> A <b>S</b> S <b>L</b> W <b>K</b> K <b>N</b> I <b>G</b> V <b>N</b> V <b>K</b> L <b>V</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> T <b>F</b> D <b>V</b> | : | 437 |
| S.son   | : | W <b>F</b> G <b>W</b> S <b>Q</b> E <b>K</b> R <b>N</b> E <b>E</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> Y <b>T</b> A <b>K</b> P <b>L</b> T <b>I</b> N <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> A <b>S</b> S <b>L</b> W <b>K</b> K <b>N</b> I <b>G</b> V <b>N</b> V <b>K</b> L <b>V</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> T <b>F</b> D <b>V</b> | : | 437 |
| S.dys   | : | W <b>F</b> G <b>W</b> S <b>Q</b> E <b>K</b> R <b>N</b> E <b>E</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> Y <b>T</b> A <b>K</b> P <b>L</b> T <b>I</b> N <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> A <b>S</b> S <b>L</b> W <b>K</b> K <b>N</b> I <b>G</b> V <b>N</b> V <b>K</b> L <b>V</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> T <b>F</b> D <b>V</b> | : | 437 |
| S.typ   | : | W <b>F</b> K <b>W</b> S <b>Q</b> Q <b>K</b> R <b>N</b> E <b>E</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> F <b>T</b> A <b>K</b> P <b>L</b> T <b>F</b> D <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> V <b>A</b> S <b>I</b> W <b>K</b> K <b>N</b> L <b>G</b> V <b>N</b> V <b>N</b> L <b>E</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> T <b>F</b> D <b>V</b> | : | 437 |
| S.ent   | : | W <b>F</b> K <b>W</b> S <b>Q</b> Q <b>K</b> R <b>N</b> E <b>E</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> F <b>T</b> A <b>K</b> P <b>L</b> T <b>F</b> D <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> V <b>A</b> S <b>I</b> W <b>K</b> K <b>N</b> L <b>G</b> V <b>N</b> V <b>N</b> L <b>E</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> T <b>F</b> D <b>V</b> | : | 476 |
| V.flu   | : | Y <b>G</b> K <b>M</b> T <b>Q</b> K <b>E</b> I <b>A</b> E <b>A</b> K <b>L</b> L <b>A</b> E <b>A</b> G <b>Y</b> D <b>K</b> S <b>N</b> P <b>L</b> K <b>F</b> T <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>E</b> N <b>H</b> K <b>K</b> I <b>A</b> T <b>A</b> I <b>Q</b> S <b>M</b> W <b>K</b> T <b>T</b> L <b>G</b> V <b>D</b> V <b>A</b> L <b>E</b> N <b>Q</b> E <b>W</b> K <b>T</b> F <b>L</b> D <b>T</b> R <b>H</b> Q <b>G</b> N <b>V</b> D          | : | 437 |
| Y.pes   | : | W <b>F</b> S <b>W</b> T <b>Q</b> E <b>K</b> R <b>N</b> E <b>V</b> A <b>K</b> L <b>L</b> A <b>E</b> A <b>G</b> Y <b>T</b> K <b>N</b> P <b>L</b> K <b>F</b> S <b>L</b> L <b>Y</b> N <b>T</b> S <b>D</b> L <b>H</b> K <b>K</b> L <b>A</b> I <b>A</b> A <b>S</b> I <b>W</b> K <b>K</b> N <b>L</b> G <b>V</b> D <b>V</b> K <b>L</b> E <b>N</b> Q <b>E</b> W <b>K</b> T <b>F</b> L <b>D</b> T <b>R</b> H <b>Q</b> G <b>T</b> Y <b>D</b> V          | : | 439 |
| 5 3Q R AKk6LaEAG5 d PL LLYNTsd HKK6A A S6Wkk 6GV V L NQEWKT5LdT QG 5DV          |   |  |   |     |
|   |   |  |   |     |
| A.hyd   | : | G <b>R</b> A <b>G</b> W <b>I</b> A <b>D</b> Y <b>N</b> E <b>A</b> S <b>S</b> M <b>L</b> D <b>L</b> Q <b>T</b> H <b>G</b> N <b>D</b> G <b>K</b> S <b>N</b> E <b>V</b> F <b>D</b> K <b>L</b> M <b>D</b> S <b>R</b> D <b>Q</b> V <b>D</b> A <b>S</b> R <b>N</b> K <b>L</b> Y <b>V</b> Q <b>A</b> E <b>I</b> I <b>L</b> A <b>K</b> D <b>M</b> P <b>I</b> A <b>P</b> I <b>Y</b> Q <b>Y</b> V <b>T</b> S <b>R</b> M <b>V</b>                       | : | 514 |
| A.sal   | : | A <b>R</b> R <b>G</b> W <b>I</b> A <b>D</b> Y <b>N</b> E <b>A</b> S <b>S</b> M <b>L</b> D <b>L</b> Q <b>T</b> H <b>G</b> N <b>D</b> G <b>K</b> S <b>N</b> E <b>V</b> F <b>D</b> K <b>L</b> M <b>D</b> S <b>R</b> D <b>Q</b> V <b>D</b> A <b>S</b> R <b>N</b> K <b>L</b> Y <b>V</b> Q <b>A</b> E <b>I</b> I <b>L</b> T <b>K</b> D <b>M</b> P <b>I</b> A <b>P</b> I <b>Y</b> Q <b>Y</b> V <b>T</b> S <b>R</b> M <b>V</b>                       | : | 516 |
| E.colK12  | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>T</b> S <b>F</b> L <b>N</b> T <b>M</b> L <b>S</b> N <b>S</b> S <b>M</b> N <b>T</b> A <b>H</b> Y <b>K</b> S <b>P</b> A <b>F</b> D <b>S</b> I <b>M</b> A <b>E</b> F <b>L</b> K <b>V</b> T <b>E</b> A <b>Q</b> R <b>T</b> A <b>L</b> Y <b>T</b> K <b>A</b> E <b>Q</b> L <b>D</b> K <b>D</b> S <b>A</b> I <b>V</b> P <b>V</b> Y <b>Y</b> V <b>N</b> A <b>R</b> L <b>V</b>            | : | 517 |
| E.colO157   | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>T</b> S <b>F</b> L <b>N</b> T <b>M</b> L <b>S</b> N <b>S</b> S <b>M</b> N <b>T</b> A <b>H</b> Y <b>K</b> S <b>P</b> A <b>F</b> D <b>S</b> I <b>M</b> A <b>E</b> F <b>L</b> K <b>V</b> T <b>E</b> A <b>Q</b> R <b>T</b> A <b>L</b> Y <b>T</b> K <b>A</b> E <b>Q</b> L <b>D</b> K <b>D</b> S <b>A</b> I <b>V</b> P <b>V</b> Y <b>Y</b> V <b>N</b> A <b>R</b> L <b>V</b>            | : | 517 |
| S.son   | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>T</b> S <b>F</b> L <b>N</b> T <b>M</b> L <b>S</b> N <b>S</b> S <b>M</b> N <b>T</b> A <b>H</b> Y <b>K</b> S <b>P</b> A <b>F</b> D <b>S</b> I <b>M</b> A <b>E</b> F <b>L</b> K <b>V</b> T <b>E</b> A <b>Q</b> R <b>A</b> L <b>Y</b> T <b>K</b> A <b>E</b> Q <b>L</b> D <b>K</b> D <b>S</b> A <b>I</b> V <b>P</b> V <b>Y</b> Y <b>V</b> N <b>A</b> R <b>L</b> V                     | : | 517 |
| S.dys   | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>T</b> S <b>F</b> L <b>N</b> T <b>M</b> L <b>S</b> N <b>S</b> S <b>M</b> N <b>T</b> A <b>H</b> Y <b>K</b> S <b>P</b> A <b>F</b> D <b>S</b> I <b>M</b> A <b>E</b> F <b>L</b> K <b>V</b> T <b>E</b> A <b>Q</b> R <b>A</b> L <b>Y</b> T <b>K</b> A <b>E</b> Q <b>L</b> D <b>K</b> D <b>S</b> A <b>I</b> V <b>P</b> V <b>Y</b> Y <b>V</b> N <b>A</b> R <b>L</b> V                     | : | 517 |
| S.typ   | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>T</b> S <b>F</b> L <b>N</b> T <b>M</b> L <b>S</b> D <b>S</b> S <b>N</b> N <b>T</b> A <b>H</b> Y <b>K</b> S <b>P</b> A <b>F</b> D <b>K</b> L <b>I</b> A <b>D</b> L <b>F</b> K <b>V</b> A <b>D</b> T <b>O</b> R <b>S</b> E <b>L</b> Y <b>A</b> K <b>A</b> E <b>Q</b> L <b>D</b> K <b>D</b> S <b>A</b> I <b>V</b> P <b>V</b> Y <b>Y</b> V <b>N</b> A <b>R</b> L <b>V</b>            | : | 517 |
| S.ent   | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>T</b> S <b>F</b> L <b>N</b> T <b>M</b> L <b>S</b> D <b>S</b> S <b>N</b> N <b>T</b> A <b>H</b> Y <b>K</b> S <b>P</b> A <b>F</b> D <b>K</b> L <b>I</b> A <b>D</b> L <b>F</b> K <b>V</b> A <b>D</b> T <b>O</b> R <b>S</b> E <b>L</b> Y <b>A</b> K <b>A</b> E <b>Q</b> L <b>D</b> K <b>D</b> S <b>A</b> I <b>V</b> P <b>V</b> Y <b>Y</b> V <b>N</b> A <b>R</b> L <b>V</b>            | : | 556 |
| V.flu   | : | T <b>R</b> A <b>G</b> W <b>G</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> A <b>S</b> S <b>F</b> L <b>S</b> L <b>Q</b> S <b>N</b> N <b>S</b> N <b>D</b> Q <b>K</b> W <b>S</b> A <b>E</b> Y <b>D</b> A <b>V</b> M <b>E</b> K <b>A</b> M <b>N</b> T <b>T</b> S <b>D</b> A <b>E</b> R <b>E</b> G <b>L</b> Y <b>V</b> D <b>A</b> E <b>K</b> L <b>A</b> R <b>D</b> M <b>P</b> I <b>A</b> P <b>I</b> Y <b>Q</b> Y <b>V</b> K <b>S</b> R <b>L</b> V                     | : | 517 |
| Y.pes   | : | A <b>R</b> A <b>G</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> N <b>E</b> P <b>S</b> S <b>F</b> L <b>N</b> M <b>L</b> S <b>N</b> S <b>S</b> N <b>N</b> T <b>T</b> H <b>Y</b> K <b>S</b> V <b>F</b> D <b>K</b> L <b>I</b> E <b>D</b> L <b>F</b> K <b>V</b> R <b>S</b> E <b>K</b> E <b>R</b> A <b>D</b> L <b>Y</b> Q <b>Q</b> A <b>E</b> I <b>Q</b> L <b>D</b> K <b>D</b> S <b>A</b> I <b>V</b> P <b>V</b> Y <b>Y</b> V <b>S</b> A <b>R</b> L <b>V</b>            | : | 519 |
| aRagWcaDYNE 3SfL M 3 s N Y sp 5D 66 d R LY AE L 4D 6 P65 YV R6V                 |   |  |   |     |
|   |   |  |   |     |
| A.hyd   | : | K <b>S</b> Y <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>P</b> A <b>-</b> N <b>P</b> L <b>D</b> N <b>L</b> Y <b>S</b> K <b>D</b> M <b>Y</b> I <b>T</b> A <b>H</b> -----   | : | 539 |
| A.sal   | : | K <b>S</b> Y <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>P</b> A <b>-</b> N <b>P</b> L <b>D</b> N <b>L</b> Y <b>S</b> K <b>D</b> M <b>Y</b> I <b>V</b> A <b>H</b> -----   | : | 541 |
| E.colK12  | : | K <b>P</b> W <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>T</b> Y <b>T</b> R <b>N</b> M <b>Y</b> I <b>V</b> K <b>H</b> -----   | : | 543 |
| E.colO157   | : | K <b>P</b> W <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>T</b> Y <b>T</b> R <b>N</b> M <b>Y</b> I <b>V</b> K <b>H</b> -----   | : | 543 |
| S.son   | : | K <b>P</b> W <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>T</b> Y <b>T</b> R <b>N</b> M <b>Y</b> I <b>V</b> K <b>H</b> -----   | : | 543 |
| S.dys   | : | K <b>P</b> W <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>T</b> Y <b>T</b> R <b>N</b> M <b>Y</b> I <b>V</b> K <b>H</b> -----   | : | 543 |
| S.typ   | : | K <b>P</b> W <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>I</b> Y <b>V</b> K <b>N</b> L <b>Y</b> I <b>K</b> H-----   | : | 543 |
| S.ent   | : | K <b>P</b> W <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>I</b> Y <b>V</b> K <b>N</b> L <b>Y</b> I <b>K</b> H-----   | : | 582 |
| V.flu   | : | S <b>E</b> T <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>P</b> A <b>G</b> N <b>A</b> E <b>K</b> I <b>Y</b> A <b>K</b> D <b>L</b> Y <b>I</b> K <b>A</b> Q-----   | : | 543 |
| Y.pes   | : | K <b>P</b> Y <b>V</b> G <b>G</b> Y <b>T</b> G <b>K</b> D <b>P</b> L <b>D</b> N <b>M</b> H <b>V</b> K <b>D</b> L <b>Y</b> I <b>K</b> Q-----   | : | 545 |
| kp VGGY 1pLdn y 416YI h   |   |  |   |     |

\*. Em vermelho as seqüências com 100% de identidade, em azul estão às seqüências com até 75% de identidade e em amarelo estão indicadas às seqüências com até 50% de identidade.

O resultado do alinhamento protéico OppA mostra regiões com maior grau de identidade, posição 241 a 320, correspondente a região central da proteínas, e outras com menor grau de identidade, posição 480 a 560, correspondente a região final da proteína OppA.

Cabe ressaltar ainda, que existem regiões (destacadas em amarelo) em que ocorre alto grau de identidade entre as enterobactérias *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella*, destacando-se do restante das bactérias Gram-negativas avaliadas.

#### **4.1.6 Análise estrutural “in silico” da OppA de *A. hydrophila* ATCC 7966**

A proteína periplásmica de ligação OppA faz parte do sistema ABC de transporte de captação de oligopeptídeos ou sistema Opp, atuando como apresentador de di-, tri-, tetra- e pentapeptídeos para porina específica. A seqüência da proteína OppA de *A. hydrophila* ATCC7966 apresenta alta homologia com aquela de *V. fluvialis* (60% de identidade e 77% de similariedade), *S. typhimurium* LT2 (57% de identidade e 74% similariedade) e *E. coli* K12 (55% identidade e 71% de similariedade), entre outras, como relacionados no quadro2.

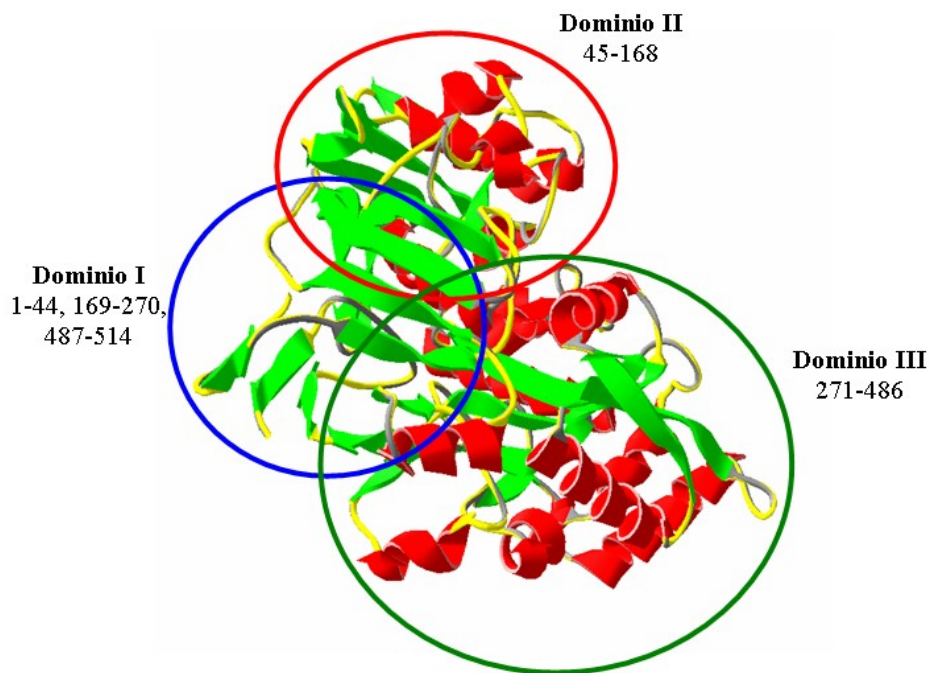
O modelo estrutural da proteína OppA de *A. hydrophila*, baseado no modelo de *S. typhimurium* (1jetA), revelou uma forma tridimensional similar constituindo uma configuração  $\alpha/\beta$  caracterizado por um trecho misto de folhas  $\beta$  cercado pelas  $\alpha$ -hélices. A proteína OppA de *A. hydrophila* apresenta três domínios estruturais principais (Figura 6).

Domínio I é formado por três seqüências não-contínuas envolvendo os resíduos de aminoácidos 1 a 44, 169 a 270 e 487 a 514, organizados em oito fitas centrais mistas de folhas  $\beta$ , enroladas pelas quatro  $\alpha$ -hélices. Domínio III, definido pelos resíduos 271 a 486, mostrando um núcleo de seis fitas folhas  $\beta$  e oito  $\alpha$ -hélices. Em analogia à OppA de *S. typhimurium*, estes dois domínios (I e III) delimitam o local de ligação ao oligopeptídeo.



O domínio II da proteína OppA de *A. hydrophila* é formado pelos aminoácidos 45 a 168 e envolve quatro fitas de folhas  $\beta$  anti-paralelas com um lado exposto para a superfície da molécula, enquanto o outro lado é cercado por quatro  $\alpha$ -hélices, delimitando um núcleo altamente hidrofóbico. Este domínio ainda não foi relacionado ao sítio de ligação ou ao acomplamento da OppA com a porina específica.

Quando comparada com o modelo OppA de *Salmonella typhimurium* (1jetA), a OppA de *A. hydrophila* apresenta três resíduos a mais nas posições 245, 384 e 498 perfazendo um polipeptídeo de 571 aminoácidos. Apesar desta diferença, a estrutura tridimensional da OppA de *A. hydrophila* apresenta alta semelhança com o modelo 1jet A (58% de identidade e E-value =  $2.148e^{-170}$ ), mostrando os três domínios típicos e um sítio de ligação que, em princípio, também permite interações eletrostáticas com um amplo espectro de peptídeos ligantes.



**Figura 6.** Modelo estrutural da proteína OppA de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, mostrando os três domínios típicos.

**Legenda:** Domínio I codificando aminoácidos 1 a 44, 169 a 270 e 487 a 514 (círculo cor azul), domínio II, delimitado pelos aminoácidos 45 a 168 (círculo cor vermelha), e domínio III formado pelos resíduos de aminoácidos 271 a 486 (círculo cor verde).

Alguns dos resíduos considerados importantes na interação peptídeo-OppA estão presentes na proteína de *A. hydrophila*, como:

(1) His 370 e Arg 411 que interagem com a terminação carboxílica de tri e tetrapeptídeos, e que correspondem aos resíduos His 371 e Arg 413 (Arg 411 e His 370 do modelo 1jetA), os quais interagem com os grupos carboxílicos da tri-lisina e de tetrapeptídios (Tame *et al.*, 1994);

(2) Os resíduos 32-34 e 415-417, EGT e GWI, respectivamente, que formam interações paralelas e antiparalelas que satisfazem à capacidade de ligações de hidrogênio do peptídeo;

(3) Os resíduos Try 109 e Arg 417 (Arg 419 em *S. typhimurium*) que interagem com o grupo  $\alpha$ -aminoterminal dos oligopeptídios;

(4) Os resíduos Trp 397, Trp 416, Leu 401 e Glu 32 (Trp 395, Trp 414, Leu 399, Glu 32 em *S. typhimurium*), os quais formam um colar apolar, são análogos em ambas OppAs;

(5) Os pares Glu 32 e His 405, de um lado, e Glu 276 e Arg 404, que flanqueiam o bolso anterior da OppA estão presentes em *Aeromonas*. No modelo de *Salmonella* o resíduo 276 corresponde a uma glutamina.

Entretanto, a OppA de *A. hydrophila* apresenta algumas diferenças com o modelo:

(1) A proteína OppA de *A. hydrophila*, assim como a de *A. salmonicida*, não possuem os resíduos de cisteína Cys 271 e Cys 417, que segundo o modelo, participam na interação não polar com a cadeia  $\beta$  do ligante junto com a Val 34 (Val 35 em *A. hydrophila*). Compensando esta ausência, a OppA de *A. hydrophila* apresenta os resíduos apolares Gly e Ile nas folhas  $\beta$  paralelas correspondentes que conferem propriedades físico-químicas semelhantes;

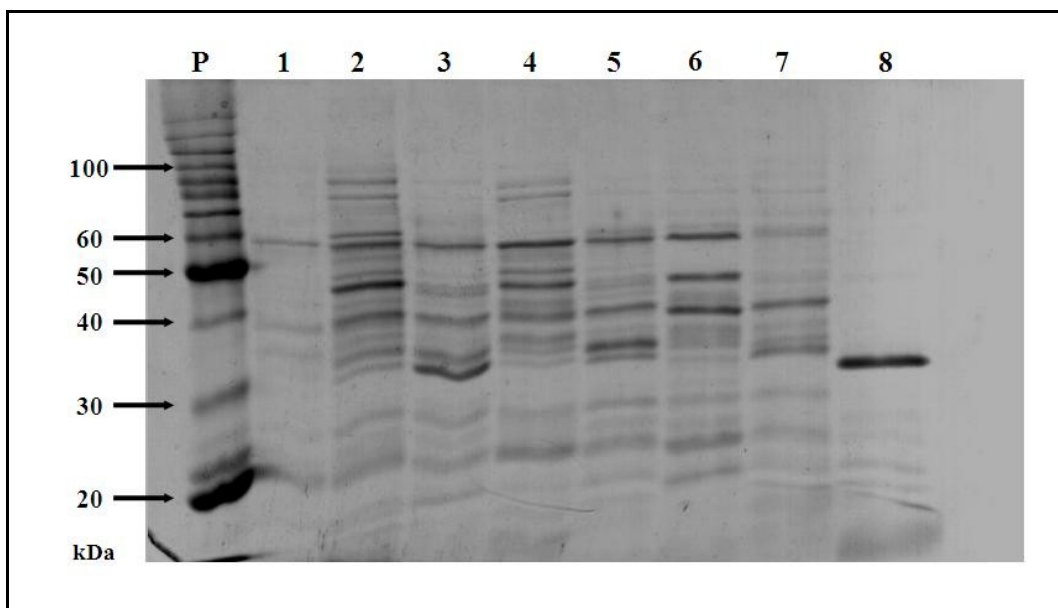
(2) O resíduo Lys307 que teoricamente participa na interação da OppA de *Salmonella* com a terminação carboxílica dos pentapeptídios, encontra-se substituída por uma metionina em *Aeromonas*. A metionina também é um aminoácido hidrofóbico, mas não é carregado, o que pode implicar em modificações na interação com alguns ligantes, já que de acordo com Tame *et al.* (1994) as interações com as cadeias laterais dos ligantes varia de peptídeo para peptídeo.

De um modo geral, a análise “in silico” da OppA de *A. hydrophila* confirma a estrutura básica de proteínas de ligação tipo “Venus flytrap” capazes de reconhecer um amplo espectro de ligantes.

#### **4.2 Extração de proteínas periplasmáticas e detecção da proteína OppA em amostras de *Aeromonas* spp.**

Com o objetivo de avaliar a expressão de proteínas periplasmáticas em *Aeromonas*, foram analisadas sete amostras de *Aeromonas* (IB Aer 002, 008, 001, 011, 016, 004 e 013), e uma de *E. coli* (controle). Para tanto, as proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida 12% em duplicata. Sendo que um gel foi corado com Comassie Brilliant Blue (Figura 7) e o outro foi feito Western blot.

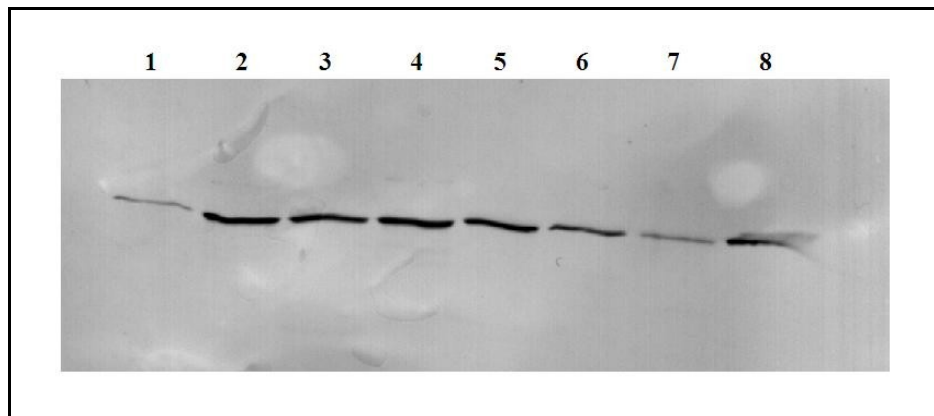
Para realização do Western blot o gel foi transferido, por meio de corrente elétrica, para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada junto com o anticorpo OppA contra *E. coli*, bloqueada, incubada com o anti-anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, e revelada.



**Figura 7.** SDS-PAGE proteínas periplasmáticas em amostras de *Aeromonas*.

**Legenda:** P- Protein Ladder (BenchMark™ – Invitrogen); 1-*A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002); 2-*A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008); 3-*A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001); 4-*A. trota* ATCC 49657 (IB Aer 011); 5-*A. eucrenophila* ATCC 23309 (IB Aer 016); 6-*A. media* ATCC 33907 (IB Aer 004); 7-*A. hydrophila* CCT 191 (IB Aer 013); 8-*E. coli* ATCC 8739.

Anticorpos anti-OppA de *E. coli* foram empregados em ensaios de imunodeteção com as amostras *A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002), *A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008), *A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001), *A. trota* ATCC 49657 (IB Aer 011), *A. eucrenophila* ATCC 23309 (IB Aer 016), *A. media* ATCC 33907 (IB Aer 004), *A. hydrophila* CCT 191 (IB Aer 013), e *E. coli* ATCC 8739. O soro mono-específico para OppA foi obtido de camundongos Balb/C com a proteína recombinante OppA de *Escherichia coli* K12. Os resultados de imunodeteção com o soro anti-OppA permitiu demonstrar que todas as sete linhagens de *Aeromonas* testadas apresentaram a proteína OppA, com massa molecular de 57,8 kDa (Figura 8). A detecção da proteína OppA em amostras de *Aeromonas* spp com anticorpo OppA de *E. coli* confirma o alto grau de conservação das seqüências protéicas em bactérias Gram-negativas, conforme previamente descrito no item 4.1.5 desta dissertação.



**Figura 8.** Imunodeteção da proteína OppA em amostras de *Aeromonas*.

**Legenda:** 1-*A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002); 2-*A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008); 3-*A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001); 4-*A. trota* ATCC 49657 (IB Aer 011); 5-*A. eucrenophila* ATCC 23309 (IB Aer 016); 6-*A. media* ATCC 33907 (IB Aer 004); 7-*A. hydrophila* CCT 191 (IB Aer 013); 8-*E. coli* ATCC 8739.

A presença da proteína OppA em todas as amostras de *Aeromonas* analisadas sugere que o sistema de transporte Opp seja de particular relevância para as Aeromonadaceae, uma via de transporte importante para a captação de peptídeos no ambiente intestinal.

Análises do sistema Opp em *Streptococcus gordonii* indicam que a proteína OppA teria um papel direto na ligação a proteínas do hospedeiro. Resultados semelhantes foram publicados sobre o envolvimento da proteína OppA com a capacidade de adesão de *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema denticola* (Cundell et al., 1995; Monnet, 2003) e em *Vibrio fluvialis* a proteína OppA afeta a produtividade de biofilme (Lee et al., 2004). Dados sobre o papel do sistema Opp sobre a virulência em amostras de *Aeromonas* não são disponíveis na literatura. No entanto, o fato de termos encontrados o gene *oppA*, e seu respectivo produto, de forma conservada em todas as amostra estudadas reforça o interesse sobre o estudo desse sistema de transporte captação de nutrientes na regulação de fatores relacionados à virulência nessas espécies de bactérias.

### 4.3 Avaliação da presença do gene *oppA* em distintas espécies de *Aeromonas*

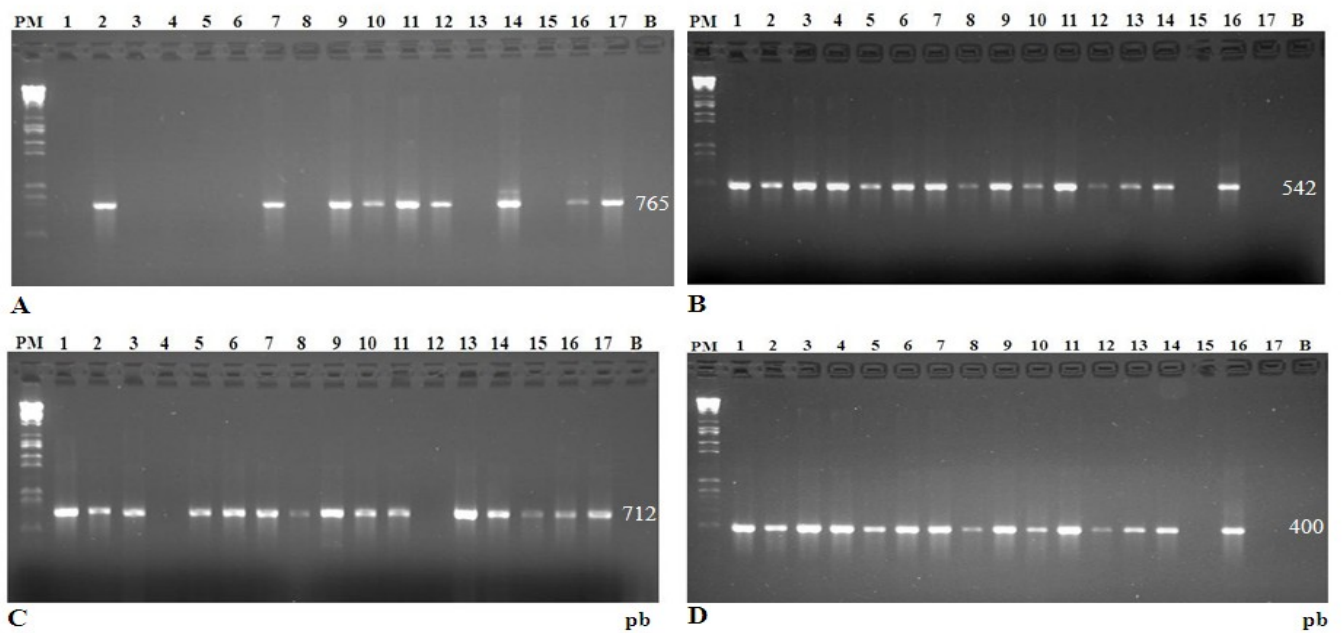
A especificidade e alta afinidade de sistemas de transporte do tipo ABC são definidas pelos componentes ligantes do substrato, encontrados na forma solúvel no periplasma de bactérias Gram-negativas ou ancoradas à membrana citoplasmática em bactérias Gram-positivas. A proteína OppA representa o componente que, em uma primeira etapa, liga o peptídeo a ser captado e o conduz até os componentes de membrana que faz o transporte para o interior da célula (Higgins, 2001). No decorrer do presente trabalho investigamos a presença do gene *oppA* e de seu respectivo produto em linhagens de *Aeromonas*.

Testes baseados na amplificação do gene *oppA* com iniciadores desenhados a partir das seqüências descritas para as espécies *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449, revelaram que das 17 amostras analisadas, todas possuíam o gene *oppA* ou fragmentos correspondentes.

#### 4.3.1 Amplificação do gene *oppA*

Dezessetes amostras de distintas espécies de *Aeromonas* (Tabela 1), foram analisadas quanto a presença do gene *oppA*. Todas as amostras foram submetidas a reações de PCR com iniciadores específicos desenhados para o gene *oppA* a partir dos genomas de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449. Foram desenhados quatro pares de *primers*, apresentados na Tabela 2. Inicialmente cada par de *primer* foi testado separadamente, e numa segunda etapa do trabalho, foram testados combinações entre os pares de *primers* desenhados.

A amplificação do conjunto de *primers* OppA5F/5R resultou em um fragmento de aproximadamente 765 pb, correspondente à seqüência genética do gene *oppA* posição 85 a 850. As amostras IB Aer 002, 007, 009, 010, 012 e 014, respectivamente *A. hydrophila* ATCC 7966, *A. hydrophila* NCIB 9233, *A. caviae* (Int. Osvaldo Cruz), *A. sobria*, *A. hydrophila* CECT 839 e *A. encheleia* CECT 4341 apresentaram banda correspondente. O resultado sugere que esta região amplificada, correspondente ao início do gene *oppA* (posição 85 a 850) é uma região pouco conservada, variando entre as distintas espécies de *Aeromonas*. (Figura 9A).



**Figura 9.** Amplificações do gene *oppA* em distintas espécies de *Aeromonas* pela PCR. **(A)** *Primers* OppA-5 (765pb); **(B)** *Primers* OppA-6 (542pb); **(C)** *Primers* OppA-7 (712pb); **(D)** *Primers* OppA-8 (400pb).

**Legenda:** PM - padrão de peso molecular (Marcador Lambda, clivado com EcoRI e HindIII); 1 - *A. sobri* ATCC 43979; 2 - *A. hydrophila* ATCC 7966; 3 - *A.ichthiosmia* ATCC 49904; 4 - *A. media* ATCC 33907; 5 - *A. salmonicida* ATCC 33658; 6 - *A. hydrophila punctata* ATCC 14486; 7 - *A. hydrophila* NCIB 9233; 8 - *A. caviae* ATCC 15468; 9 - *A. caviae* Instituto Osvaldo Cruz; 10 - *A. sobria* Instituto Osvaldo Cruz; 11 - *A. trota* ATCC 49657; 12 - *A. hydrophila* CECT 839; 13 - *A. hydrophila* CCT 191; 14 - *A. encheleia* CECT 4341; 15 - *A. veronii* ATCC 35624; 16 - *A. eucrenophila* ATCC 23309; 17 - *A. allosaccharophila* ATCC 51208; B - branco.

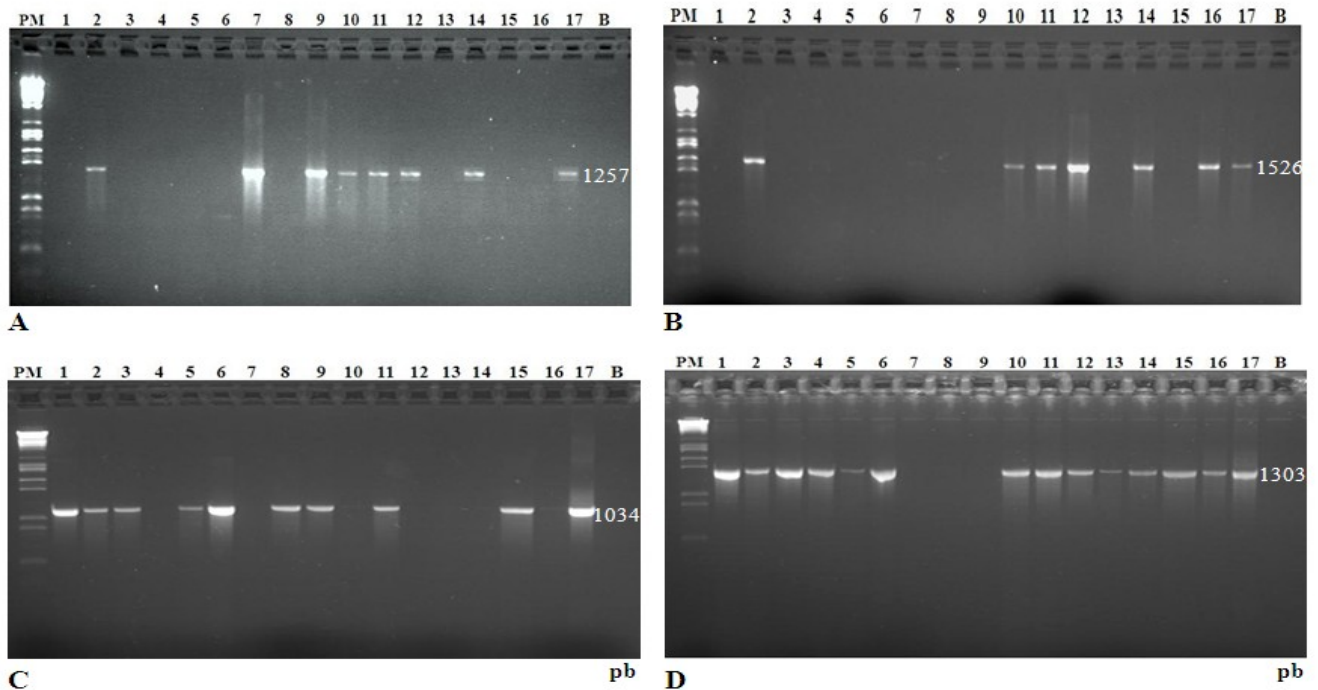


Já para o segundo par de *primers* (OppA6), amplificando um fragmento de aproximadamente 542pb em 15 das 17 linhagens de *Aeromonas* testadas (Figura 9B), este dado sugere que esta região do gene *oppA* (posição 308 a 850) seja mais conservada em relação a posição inicial do gene. Resultados semelhantes foram visualizados com os conjuntos de *primers* OppA7 (fragmentos de 712pb) e OppA8 (fragmentos de 400pb), que amplificaram os mesmos oligonucleotídeos em 16 das 17 amostras de distintas espécies de *Aeromonas* (Figura 9C e 9D).

Estes resultados mostraram que, da posição 308 a 1611 do gene, foi amplificado na maioria das 17 amostras de *Aeromonas* analisadas, sugerindo a conservação desta região nas diferentes linhagens de *Aeromonas*. Apenas a região inicial do gene, posição 85 a 305, não foi amplificada na maioria das amostras, sugerindo, portanto, que esta região é pouco conservada entre espécies deste gênero.

Em outro momento, testamos combinações entre os *primers* que foram desenhados para este trabalho. Analisamos o primer OppA-5F e OppA-7R, que revelou fragmentos de aproximadamente 1257pb, correspondente a região 85 a 1342 do gene *oppA*, oito amostras apresentaram banda característica. Uma segunda combinação de *primers* OppA-5F e OppA-8R, resultou em fragmentos de 1526pb, representante da região 85 a 1611 do gene *oppA*, revelou sete amostras das 17 analisadas (Figuras 10A e 10B).

A partir de outra combinação OppA-6F juntamente com o *primer* OppA-7R, amplificando fragmentos de aproximadamente 1034 pb, correspondente a região 308 a 1342 do gene *oppA*, revelou que das 17 amostras de *Aeromonas* spp., testadas 10 apresentaram banda correspondente. Em outra reação de PCR utilizando os *primers* OppA-6F e OppA-8R, amplificou fragmentos de aproximadamente 1303pb, correspondente a região 308 a 1611 do gene *oppA*, revelou que deste par de *primers*, 14 amostras de *Aeromonas* spp., amplificaram a região correspondente (Figuras 10C e 10D).



**Figura 10.** Amplificações do gene *oppA* em distintas espécies de *Aeromonas* pela PCR. **(A)** *Primers* OppA-5F/OppA-7R (1257pb); **(B)** *Primers* OppA-5F/OppA-8R (1526pb); **(C)** *Primers* OppA-6F/OppA7R (1034pb); **(D)** *Primers* OppA-6F/OppA-8R (1303pb).

**Legenda:** PM - padrão de peso molecular; 01 - *A. sobri* ATCC 43979; 02 - *A. hydrophila* ATCC 7966; 03 - *A. ichthiosmia* ATCC 49904; 04 - *A. media* ATCC 33907; 05 - *A. salmonicida* ATCC 33658; 06 - *A. hydrophila punctata* ATCC 14486; 07 - *A. hydrophila* NCIB 9233; 08 - *A. caviae* ATCC 15468; 09 - *A. caviae* Instituto Osvaldo Cruz; 10 - *A. sobria* Instituto Osvaldo Cruz; 11 - *A. trola* ATCC 49657; 12 - *A. hydrophila* CECT 839; 13 - *A. hydrophila* CCT 191; 14 - *A. encheleia* CECT 4341; 15 - *A. veronii* ATCC 35624; 16 - *A. eucrenophila* ATCC 23309; 17 - *A. allosaccharophila* ATCC 51208; B - branco.

Portanto, das 17 amostras testadas, sete (IB Aer 002, 010, 011, 012, 014 e 016), amplificaram um fragmento de 1526pb, correspondente a seqüência genética completa esperada do gene *oppA*, visto que, os *primers* foram desenhados a partir do genoma de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. salmonicida* A449 (Figura 10B).

O sistema Opp está envolvido em diferentes aspectos da fisiologia bacteriana, além da captação de nutrientes, como a reciclagem de peptídeos da parede para síntese do peptidoglicano, sinalização intracelular, desenvolvimento do estado de competência,

desencadeamento do processo de esporulação (*Bacillus subtilis*), promoção da conjugação (*Enterococcus faecalis*) e crescimento a baixas temperaturas (*Listeria monocytogenes*) (Borezee *et al.*, 2000; Monnet, 2003; Balan *et al.*, 2008). A presença do gene *oppA* em todas as amostras de *Aeromonas* analisadas sugere que o sistema de transporte Opp seja de particular relevância para este gênero, provavelmente uma via de transporte importante para a captação de peptídeos no ambiente intestinal e sua adaptação em diferentes ambientes.

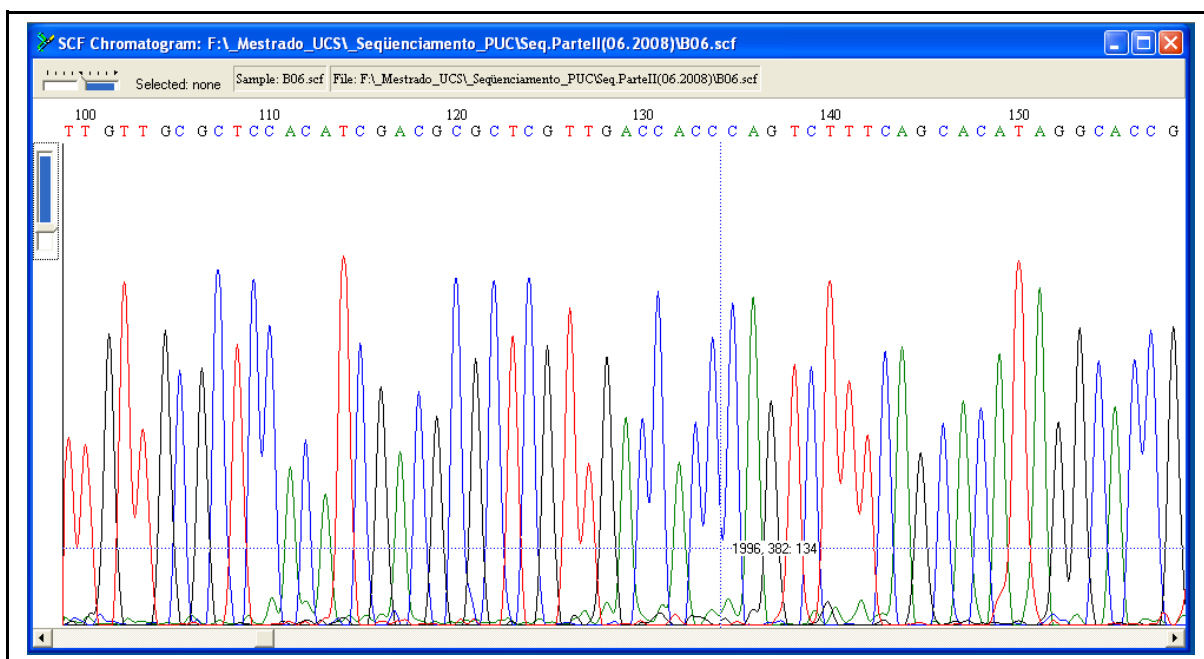
#### **4.4 Seqüência do gene *oppA* e da proteína OppA em *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae***

Com o objetivo de sequenciar o gene *oppA* de diferentes espécies de *Aeromonas*, produtos de PCR amplificados a partir dos *primers* desenhados (Tabela 2), foram purificados e submetidos a reações de seqüenciamento, conforme descrito no item 3.6.

O gene *oppA* completo, correspondente a 1620 pb, foi seqüenciado em três espécies de *Aeromonas* (*A. hydrophila* ATCC 7966 – IB Aer 002; *A. sobria* ATCC 43979 – IB Aer 001; *A. caviae* ATCC 15468 – IB Aer 008). Sabe-se que as espécies *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* representam as três espécies clinicamente mais importantes, tendo sido associadas a distintas doenças em seres humanos, particularmente gastroenterites. A sua crescente relevância tem levado a sua classificação, por parte da OMS, como patógenos emergentes veiculados por água e alimentos (Janda & Abbott, 1998).

Como pode ser observado na Figura 11, os cromatogramas de seqüenciamento apresentaram qualidade elevada, permitindo a definição inequívoca das seqüências do gene *oppA* das espécies avaliadas. Neste sentido cabe ressaltar que a seqüência obtida para a

linhagem *A. hydrophila* ATCC7966 foi idêntica àquela depositada no GeneBank (gi 117619267).



**Figura 11.** Cromatograma do seqüenciamento da amostra IB Aer 002 (*A. hydrophila* ATCC 7966).

As seqüências obtidas com cada par de *primers* foram alinhadas formando um único “contig” de 1620 pb para cada espécie, correspondente à seqüência completa do gene *oppA*. Obtida a seqüência completa foi realizado o alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *oppA*, primeiramente nas três espécies de *Aeromonas* com seqüência completa, além da seqüência de *A. salmonicida* disponível no NCBI (Quadro 5). As seqüências nucleotídicas foram alinhadas e marcadas para 100% de identidade em vermelho, 75% em azul e ate 50% de identidade em amarelo. Todas as seqüências foram editadas com o programa GeneDoc após o alinhamento obtido com o programa BioEdit. A numeração à direita de cada seqüência refere-se ao número do último nucleotídeo representado em cada linha.

**Quadro 5.** Alinhamento das seqüências nucleotídicas *oppA* das linhagens *A. hydrophila* ATCC7966 (IBAer002), *A. sobria* ATCC43979 (IBAer001) e *A. caviae* ATCC15468 (IBAer008) e *A. salmonicida* A449#.

|  |   |  |   |     |
|--|---|--|---|-----|
| A. hyd. ATCC7966   | : | ATGACTCATAAAAAACAATGATTAATACCCTTTGGTGGCAGCACTTTCGGCGGTGTCAACGCGGCACAAGCGCCGA     | : | 80  |
| A. sob. ATCC4397   | : | ATGACTCATAAAAAACAATGATTAATACCCTTTGGTGGCAGCACTTTCGGCGGTGTCAACGCGGCACAAGCGCCGA     | : | 80  |
| A. cav. ATCC1546   | : | ATGACTCATAAAAAACAATGATTAATACCCTTTGGTGGCAGCACTTTCGGCGGTGTCAACGCGGCACAAGCGCCGA     | : | 80  |
| A. sal. A449   | : | ATGACTCATAAAAAACAATGATTAATACCCTTTGGTGGCAGCACTTTCGGCGGTGTCAACGCGGCACAAGCGCCGA     | : | 80  |
| ATGACTCATAAAAAACAATGATTAATACCCTTTGGTGGCAGCACTTTCGGCGGTGTCAACGCGGCACAAGCGCCGA     |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | TGTTCCCGCAGGTACCAAACCTGCTGAGTTCAGCAGCTGGTAAAAGGCAATGGCTCCGAGCCCTGCCACTCTCGACCCCG | : | 160 |
| A. sob. ATCC4397   | : | TGTTCCCGCAGGTACCAAACCTGCTGAGTTCAGCAGCTGGTAAAAGGCAATGGCTCCGAGCCCTGCCACTCTCGACCCCG | : | 160 |
| A. cav. ATCC1546   | : | TGTTCCCGCAGGTACCAAACCTGCTGAGTTCAGCAGCTGGTAAAAGGCAATGGCTCCGAGCCCTGCCACTCTCGACCCCG | : | 160 |
| A. sal. A449   | : | TGTTCCCGCAGGTACCAAACCTGCTGAGTTCAGCAGCTGGTAAAAGGCAATGGCTCCGAGCCCTGCCACTCTCGACCCCG | : | 160 |
| TGTTCCCGCAGGTACCAAACCTGCTGAGTTCAGCAGCTGGTAAAAGGCAATGGCTCCGAGCCCTGCCACTCTCGACCCCG |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | ACAAAACCGAAGGAACGGTGAATCCAATATCTCGCTGACCTGTTTCGAAGGCTCTGTTGCCTCGGCCCAAAAGGGGA    | : | 240 |
| A. sob. ATCC4397   | : | ACAAAACCGAAGGAACGGTGAATCCAATATCTCGCTGACCTGTTTCGAAGGCTCTGTTGCCTCGGCCCAAAAGGGGA    | : | 240 |
| A. cav. ATCC1546   | : | ACAAAACCGAAGGAACGGTGAATCCAATATCTCGCTGACCTGTTTCGAAGGCTCTGTTGCCTCGGCCCAAAAGGGGA    | : | 240 |
| A. sal. A449   | : | ACAAAACCGAAGGAACGGTGAATCCAATATCTCGCTGACCTGTTTCGAAGGCTCTGTTGCCTCGGCCCAAAAGGGGA    | : | 240 |
| ACAAAACCGAAGGAACGGTGAATCCAATATCTCGCTGACCTGTTTCGAAGGCTCTGTTGCCTCGGCCCAAAAGGGGA    |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | GTGCTTCCCGCATGGCCGAGTCTGGGAAACCAAGGACAACAACACTTCGTGTTCCACCTGCGCAAAGATGCCAAGTG    | : | 320 |
| A. sob. ATCC4397   | : | GTGCTTCCCGCATGGCCGAGTCTGGGAAACCAAGGACAACAACACTTCGTGTTCCACCTGCGCAAAGATGCCAAGTG    | : | 320 |
| A. cav. ATCC1546   | : | GTGCTTCCCGCATGGCCGAGTCTGGGAAACCAAGGACAACAACACTTCGTGTTCCACCTGCGCAAAGATGCCAAGTG    | : | 320 |
| A. sal. A449   | : | GTGCTTCCCGCATGGCCGAGTCTGGGAAACCAAGGACAACAACACTTCGTGTTCCACCTGCGCAAAGATGCCAAGTG    | : | 320 |
| t CT CCG c TgGCCGAGTCTGGGAAACCAAGGACAACAACACTTCGTGTTCCACCTGCGCAAAGATGCCAAGTG     |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | GTCCAACGGGGATCCCGTGCACGCCCAAGATTTCCGAGTTCCGCTTCAAGCGGGCGTGGATCCCAAGACGGGCTCCCT   | : | 400 |
| A. sob. ATCC4397   | : | GTCCAACGGGGATCCCGTGCACGCCCAAGATTTCCGAGTTCCGCTTCAAGCGGGCGTGGATCCCAAGACGGGCTCCCT   | : | 400 |
| A. cav. ATCC1546   | : | GTCCAACGGGGATCCCGTGCACGCCCAAGATTTCCGAGTTCCGCTTCAAGCGGGCGTGGATCCCAAGACGGGCTCCCT   | : | 400 |
| A. sal. A449   | : | GTCCAACGGGGATCCCGTGCACGCCCAAGATTTCCGAGTTCCGCTTCAAGCGGGCGTGGATCCCAAGACGGGCTCCCT   | : | 400 |
| GTCCAACGGGGATCCCGTGCACGCCCAAGATTTCCGAGTTCCGCTTCAAGCGGGCGTGGATCCCAAGACGGGCTCCCT   |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | ACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATGTCATGCCAGGAGATCATGCCGGCAAGAAAGCGCCGACACCTGGGC       | : | 480 |
| A. sob. ATCC4397   | : | ACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATGTCATGCCAGGAGATCATGCCGGCAAGAAAGCGCCGACACCTGGGC       | : | 480 |
| A. cav. ATCC1546   | : | ACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATGTCATGCCAGGAGATCATGCCGGCAAGAAAGCGCCGACACCTGGGC       | : | 480 |
| A. sal. A449   | : | ACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATGTCATGCCAGGAGATCATGCCGGCAAGAAAGCGCCGACACCTGGGC       | : | 480 |
| ActCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATGTCATGCCAGGAGATCATGCCGGCAAGAAAGCGCCGACACCTGGGC       |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | GTGAAGGCAGTGACGACTACACCTTCGAGGTGCAGCTGGAGAAGGCGTGCCTTACTTCGTCAGCATGCTCTCCACAC    | : | 560 |
| A. sob. ATCC4397   | : | GTGAAGGCAGTGACGACTACACCTTCGAGGTGCAGCTGGAGAAGGCGTGCCTTACTTCGTCAGCATGCTCTCCACAC    | : | 560 |
| A. cav. ATCC1546   | : | GTGAAGGCAGTGACGACTACACCTTCGAGGTGCAGCTGGAGAAGGCGTGCCTTACTTCGTCAGCATGCTCTCCACAC    | : | 560 |
| A. sal. A449   | : | GTGAAGGCAGTGACGACTACACCTTCGAGGTGCAGCTGGAGAAGGCGTGCCTTACTTCGTCAGCATGCTCTCCACAC    | : | 560 |
| GTGAAGGCAGTGACGACTACACCTTCGAGGTGCAGCTGGAGAAGGCGTGCCTTACTTCGTCAGCATGCTCTCCACAC    |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | CACCACCTACCCGGTCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTGGTGAAAGTGGACCCAGCCCGCAACATGGTATCCAACG     | : | 640 |
| A. sob. ATCC4397   | : | CACCACCTACCCGGTCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTGGTGAAAGTGGACCCAGCCCGCAACATGGTATCCAACG     | : | 640 |
| A. cav. ATCC1546   | : | CACCACCTACCCGGTCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTGGTGAAAGTGGACCCAGCCCGCAACATGGTATCCAACG     | : | 640 |
| A. sal. A449   | : | CACCACCTACCCGGTCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTGGTGAAAGTGGACCCAGCCCGCAACATGGTATCCAACG     | : | 640 |
| CACCACCTACCCGGTCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTGGTGAAAGTGGACCCAGCCCGCAACATGGTATCCAACG     |   |  |   |     |
| A. hyd. ATCC7966   | : | GTGCCTATCTGCTGAAGGATGGGTGGTCAACGACCGCGTCAAGCTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAACGCAAG  | : | 720 |
| A. sob. ATCC4397   | : | GTGCCTATCTGCTGAAGGATGGGTGGTCAACGACCGCGTCAAGCTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAACGCAAG  | : | 720 |
| A. cav. ATCC1546   | : | GTGCCTATCTGCTGAAGGATGGGTGGTCAACGACCGCGTCAAGCTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAACGCAAG  | : | 720 |
| A. sal. A449   | : | GTGCCTATCTGCTGAAGGATGGGTGGTCAACGACCGCGTCAAGCTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAACGCAAG  | : | 720 |
| GTGCCTATCTGCTGAAGGATGGGTGGTCAACGACCGCGTCAAGCTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAACGCAAG  |   |  |   |     |

\* 740 \* 760 \* 780 \* 800  
 A.hyd.ATCC7966 : ACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACGCCGAGCTGAACCGCTATCTGGCTGGCGAAGTGGGA : 800  
 A.sob.ATCC4397 : ACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACGCCGAGCTGAACCGCTATCTGGCTGGCGAAGTGGGA : 800  
 A.cav.ATCC1546 : ACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACGCCGAGCTGAACCGCTATCTGGCTGGCGAAGTGGGA : 800  
 A.sal.A449 : ACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACGCCGAGCTGAACCGCTATCTGGCTGGCGAAGTGGGA : 800  
 ACcGtCAtCAcAaAGGTGAcCTA CTGCC ATCCAGTCCACCAACGCCGAgcTGAACCGCTATCTGGC GGcGAagTGGGA

\* 820 \* 840 \* 860 \* 880  
 A.hyd.ATCC7966 : TCTTACCTACAACATGCCCATCGAGCGCTTCAAGCAGATGAAGAAAGGACTGCTGCCAACGAGGTTAAGGTTAGCGGCTATG : 880  
 A.sob.ATCC4397 : TCTCACCTACAACATGCCCATCGAGCGCTTCAAGCAGATGAAGAAAGGACTGCTGCCAACGAGGTTAAGGTTAGCGGCTATG : 880  
 A.cav.ATCC1546 : TCTGACCTACAACATGCCCATCGAGCGCTTCAAGCAGATGAAGAAAGGACTGCTGCCAACGAGGTTAAGGTTAGCGGCTATG : 880  
 A.sal.A449 : TCTTACCTACAACATGCCCATCGAGCGCTTCAAGCAGATGAAGAAAGGACTGCTGCCAACGAGGTTAAGGTTAGCGGCTATG : 880  
 TCT ACCTACAACATGCCCATCGAGcCGCTTCAAGCAGATGAAGAA GAgCTGCC aACGAgGTgAAGGTgAGcGGCTAtG

\* 900 \* 920 \* 940 \* 960  
 A.hyd.ATCC7966 : TCGGTACCTACTACTACAGTACAACCTTCAAGCAACAAGCCGTTTGATGACGTCGGGGTTCGTACCGCCCTCTCTTATGCC : 960  
 A.sob.ATCC4397 : TCGGTACCTACTACTACAGTACAACCTTCAAGCAACAAGCCGTTTGATGACGTCGGGGTTCGTACCGCCCTCTCTTATGCC : 960  
 A.cav.ATCC1546 : TGGGCACCTACTACTACAGTACAACCTTCAAGCAACAAGCCGTTTGATGACGTCGGGGTTCGTACCGCCCTCTCTTATGCC : 960  
 A.sal.A449 : TGGGACCTACTACTACACCTTCAACACCAAGCCGTTTGATGACGTCGGGGTTCGTACCGCCCTCTCTTATGCC : 960  
 T GG ACCTACTACTACcagTaCAACtTcAA CaCAAgCcTtTGAcGA GTgCGGGTgCGTAcCcCcTctc TAtGCC

\* 980 \* 1000 \* 1020 \* 1040  
 A.hyd.ATCC7966 : ATCGACCGCAACGTGATCGCCGACAAGGTGATGGGCAAGGGCGAGACTCCGGGTATACCCCTGTGCCTGATTTCTGTGGA : 1040  
 A.sob.ATCC4397 : ATCGACCGCAACGTGATCGCCGACAAGGTGATGGGCAAGGGCGAGACTCCGGGTATACCCCTGTGCCTGATTTCTGTGGA : 1040  
 A.cav.ATCC1546 : ATCGATCGCAACGTGATCGCCGACAAGGTGATGGGCAAGGGCGAAGCCCGGGTATACCGCTGTGCCTGATTTCTGTGGA : 1040  
 A.sal.A449 : ATCGACCGTGAACGTGATCGCCGACAAGGTGATGGGCAAGGGCGAAGCAACCGGGTATACCCCTGTGCCTGATTTCTGTGGA : 1040  
 ATCGAcCGcaACGTGATCGCCGACAAGGTGATGGGCAAGGGcGA AC CCGGGcTAtaCcTgTGCCCTGATtT GTgGA

\* 1060 \* 1080 \* 1100 \* 1120  
 A.hyd.ATCC7966 : CGGTTTCAAGCCGGTGGCCCGCTGGTCCAAGCTGACCCAGGCAGAGCGCGATGCCAAGGCCAAAGAGCTGTGTGACC : 1120  
 A.sob.ATCC4397 : CGGTTTCAAGCCGGTGGCCCGCTGGTCCAAGCTGACCCAGGCAGAGCGCGATGCCAAGGCCAAAGAGCTGTGTGACC : 1120  
 A.cav.ATCC1546 : TGGTTTCAAGCCGGTGGCCCGCTGGTCCAAGCTGACCCAGGCAGAGCGCGATGCCAAGGCCAAAGAGCTGTGTGACC : 1120  
 A.sal.A449 : TGGTTTCAAGCCGGTGGCCCGCTGGTCCAAGCTGACCCAGGCAGAGCGCGATGCCAAGGCCAAAGAGCTGTGTGACC : 1120  
 GGCtTTCaAgCCGGTgGcGcCcGtTGGTCCAAGcTGACCCAGGCAGAGCGCGATgCCAAGGCgAAAGagcTgGcTGaccG

\* 1140 \* 1160 \* 1180 \* 1200  
 A.hyd.ATCC7966 : AAGCCGGTTTGGCCCGCCGCAAAACCGCTCAAGTTCGAGCTGTCTTACAACACCAGCAGACAACCACAAGAAAGTGCCTG : 1200  
 A.sob.ATCC4397 : AAGCCGGTTTGGCCCGCCGCAAAACCGCTCAAGTTCGAGCTGTCTTACAACACCAGCAGACAACCACAAGAAAGTGCCTG : 1200  
 A.cav.ATCC1546 : AAGCCGGTTTGGCCCGCCGCAAAACCGCTCAAGTTCGAGCTGTCTTACAACACCAGCAGACAACCACAAGAAAGTGCCTG : 1200  
 A.sal.A449 : AAGCCGGATATGGCCCGCCGCAAAACCGCTCAAGTTCGAGCTGTCTTACAACACCAGCAGACAACCACAAGAAAGTGCCTG : 1200  
 AaGcCGGtT cGgCCGgGcCAAA CCGCTCAAGTTCGAGCTGTCTTACAACAcGACGACAACCACAAGAA GT GcGtT

\* 1220 \* 1240 \* 1260 \* 1280  
 A.hyd.ATCC7966 : GCCGTGCGCTCCATGTGGAAGAAGCTGGCGTGCAGGTGAGCCTGGTCAACCAGGAGTGGAAAACCTACTGGAACACCA : 1280  
 A.sob.ATCC4397 : GCCGTGCGCTCCATGTGGAAGAAGCTGGCGTGCAGGTGAGCCTGGTCAACCAGGAGTGGAAAACCTACTGGAACACCA : 1280  
 A.cav.ATCC1546 : GCCGTGCGCTCCATGTGGAAGAAGCTGGCGTGCAGGTGAGCCTGGTCAACCAGGAGTGGAAAACCTACTGGAACACCA : 1280  
 A.sal.A449 : GCCGTGCGCTCCATGTGGAAGAAGCTGGCGTGCAGGTGAGCCTGGTCAACCAGGAGTGGAAAACCTACTGGAACACCA : 1280  
 GCCGT GCCTCCATGTGGAAGAAGCTgGGCGTGCAGGT AGCCTGGT AACCAGGAgTGGAA ACctAcCTGGA ACcaa

\* 1300 \* 1320 \* 1340 \* 1360  
 A.hyd.ATCC7966 : GAAGCAGGGTCAGTTTGATGTTGCTCGTCCCGGCTGGATCGCCGACTACAACGAAGCTCTTCCATGCTGGATCTGATGC : 1360  
 A.sob.ATCC4397 : TAAGCAGGGTCAGTTTGATGTTGCTCGTCCCGGCTGGATCGCCGACTACAACGAAGCTCTTCCATGCTGGATCTGATGC : 1360  
 A.cav.ATCC1546 : GAAGCAGGGTCAGTTTGATGTTGCTCGTCCCGGCTGGATCGCCGACTACAACGAAGCTCTTCCATGCTGGATCTGATGC : 1360  
 A.sal.A449 : TAAGCAGGGTCAGTTTGATGTTGCTCGTCCCGGCTGGATCGCCGACTACAACGAAGCTCTTCCATGCTGGATCTGATGC : 1360  
 AAGCAGGGtCAGTTTGA GT GgTCGTgCgCGGcTGGATCGCCGACTACAACGAAGCcTC TCCATGCTGGATCTGATGC

\* 1380 \* 1400 \* 1420 \* 1440  
 A.hyd.ATCC7966 : AGACCAGTCACGGCAACAACGACGGCAAACTACTCCAACCCGGCTTTTGACAAGCTGATGAAACGAGTGGCGCAATCAGGTTG : 1440  
 A.sob.ATCC4397 : AGACCAGTCACGGCAACAACGACGGCAAACTACTCCAACCCGGCTTTTGACAAGCTGATGAAACGAGTGGCGCAATCAGGTTG : 1440  
 A.cav.ATCC1546 : AGACCAGTCACGGCAACAACGACGGCAAACTACTCCAACCCGGCTTTTGACAAGCTGATGAAACGAGTGGCGCAATCAGGTTG : 1440  
 A.sal.A449 : AGACCAGTCACGGCAACAACGATGGCAAACTACTCCAACCCGGCTTTTGACAAGCTGATGAAACGAGTGGCGCAATCAGGTTG : 1440  
 AGACCAC CACGGCAACAACGAcGGCAAgTACTCCAAC CCGG gTT GACAAGCTGATGgA GTC CG gAtCAGGT

\* 1460 \* 1480 \* 1500 \* 1520  
 A.hyd.ATCC7966 : GATGCTATCCCGCAACAAGCTCTATGTCAGGCTGAAGAGATCCTGGCCAAAGGACATGCCGATCGCTCCCATCTATCA : 1520  
 A.sob.ATCC4397 : GATGCTATCCCGCAACAAGCTCTATGTCAGGCTGAAGAGATCCTGGCCAAAGGACATGCCGATCGCTCCCATCTATCA : 1520  
 A.cav.ATCC1546 : GATGCTATCCCGCAACAAGCTCTATGTCAGGCTGAAGAGATCCTGGCCAAAGGACATGCCGATCGCTCCCATCTATCA : 1520  
 A.sal.A449 : GATGATCTCCCGCAACAAGCTCTATGTCAGGCTGAAGAGATCCTGGCCAAAGGACATGCCGATCGCTCCCATCTATCA : 1520  
 GATG Gc gCCCg AACAAgCTCTA GTcCAGGcTGAAGAGATCCTTgGcCAAGGACATGCCGAT GcCCCATCTA CA

\* 1540 \* 1560 \* 1580 \* 1600  
 A.hyd.ATCC7966 : GTACGTGACTGCCCGATGGTCAAAGTCTTACCTGTTGGCGGCTACCCGGCCAAACCCGCTGGACAACTCTACAGCAAAGACA : 1600  
 A.sob.ATCC4397 : GTACGTGACTGCCCGATGGTCAAAGTCTTACCTGTTGGCGGCTACCCGGCCAAACCCGCTGGACAACTCTACAGCAAAGACA : 1600  
 A.cav.ATCC1546 : GTACGTGACTGCCCGATGGTCAAAGTCTTACCTGTTGGCGGCTACCCGGCCAAACCCGCTGGACAACTCTACAGCAAAGACA : 1600  
 A.sal.A449 : GTACGTGACTGCCCGATGGTCAAAGTCTTACCTGTTGGCGGCTACCCGGCCAAACCCGCTGGACAACTCTACAGCAAAGACA : 1600  
 GTACGTGAC CCG ATGGTCAA CCTAtGT GCGGCTACCCGGCCAAACCCGCTGGAcAACTCTACAGCAAAGACA

|                  | *                    | 1620   |
|------------------|----------------------|--------|
| A. hyd. ATCC7966 | TGTACATCATTGCTCACTGA | : 1620 |
| A. sob. ATCC4397 | TGTACATCATTGCTCACTGA | : 1620 |
| A. cav. ATCC1546 | TGTACATCATTGCTCACTGA | : 1620 |
| A. sal. A449     | TGTACATCATTGCTCACTGA | : 1620 |
|                  | TGTACATCaTTGCTCACTGA |        |

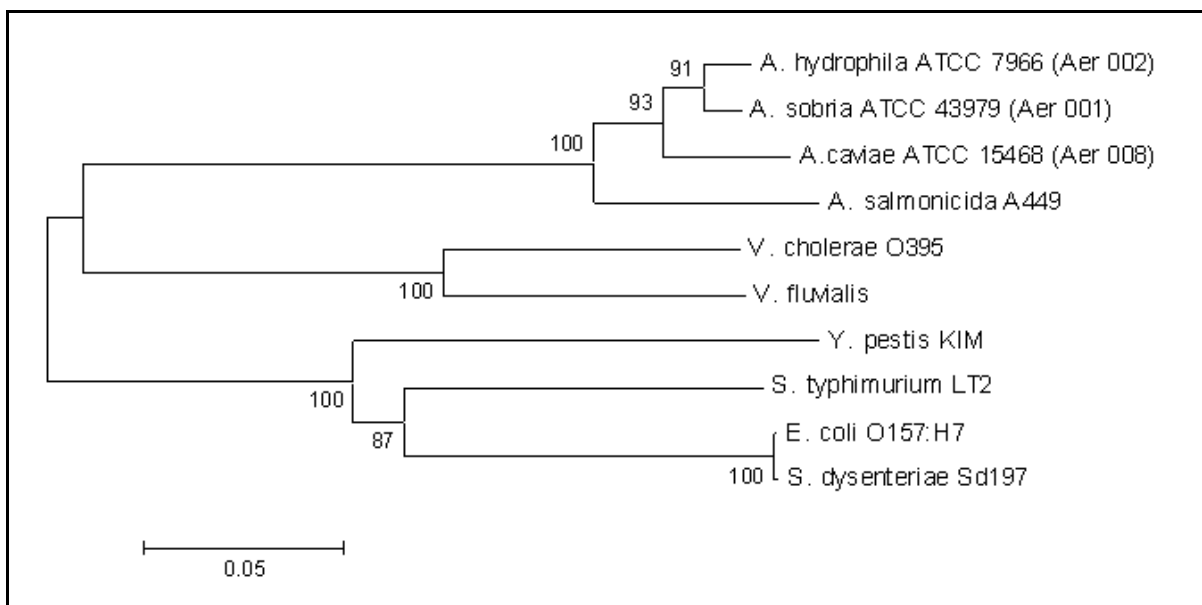
#. Em vermelho as seqüências com 100% de identidade, em azul estão às seqüências com até 75% de identidade e em amarelo estão indicadas às seqüências com até 50% de identidade.

O alinhamento mostra alto grau de homologia, principalmente entre as espécies seqüenciadas neste trabalho. Cabe ressaltar, que *A. sobria* mostra maior semelhança à *A. hydrophila* do que *A. caviae*, e que *A. salmonicida*, reconhecidamente a mais distante em termos filogenético (Martínez-Murcia, 1999; Yañez *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2006).

Historicamente, o gênero *Aeromonas* foi dividido em dois grupos: um grupo hidrófila representado pelas espécies móveis, que são associadas com doenças em humanos, e um segundo grupo, que inclui as espécies não móveis psicrofílas, representada pela *A. salmonicida* que são associadas com doenças em peixes (Seshadri *et al.*, 2006). Portanto, os dados obtidos no seqüenciamento do *oppA* vem confirmar a diferença entre espécies móveis e não móveis.

A partir dos resultados obtidos através do seqüenciamento completo do gene *oppA*, e de seqüências correspondentes a este gene em diferentes bactérias Gram-negativas, incluindo espécies da família Enterobacteriaceae e Vibrionaceae, desenhamos um dendrograma (Figura 12). Neste dendrograma podem ser evidenciados três grupos, correspondentes às quatro espécies de *Aeromonas*, às duas espécies de *Vibrio*, e às quatro espécies representantes da família Enterobacteriaceae.

Com base nestes resultados podemos salientar, que a espécie *A. salmonicida*, esta claramente separada do restante do grupo das *Aeromonas*, como revelado pela distância entre esta linhagem em relação às demais espécies do mesmo gênero.



**Figura 12.** Dendrograma baseado no alinhamento de sequência nucleotídica do gene *oppA*. O Dendrograma foi calculado utilizando algoritmo Neighbor-joining e bootstrap (100 replicas). Distâncias “Maximum Composite Likelihood”.

É evidente a partir da Figura 12 e 13, que o gênero *Aeromonas* (família Aeromonadaceae) forma um grupo distinto, separado da família Enterobacteriaceae e da família Vibrionaceae. Estes dados concordam com um estudo filogenético baseado em sequências do gene 16s rRNA (Martínez-Murcia, *et al.*, 1992) além, de apoiar o reconhecimento da família *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986).

Para a análise de similitude das proteínas OppA foi realizada a tradução “in silico” das sequências apresentadas no Quadro 5, estas sequências protéicas foram alinhadas (Quadro 6).

Conforme pode ser apreciado no Quadro 6, 48 trocas de aminoácidos foram evidenciadas entre as três linhagens *A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002), *A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001), *A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008), e *A. salmonicida* A449, sendo que

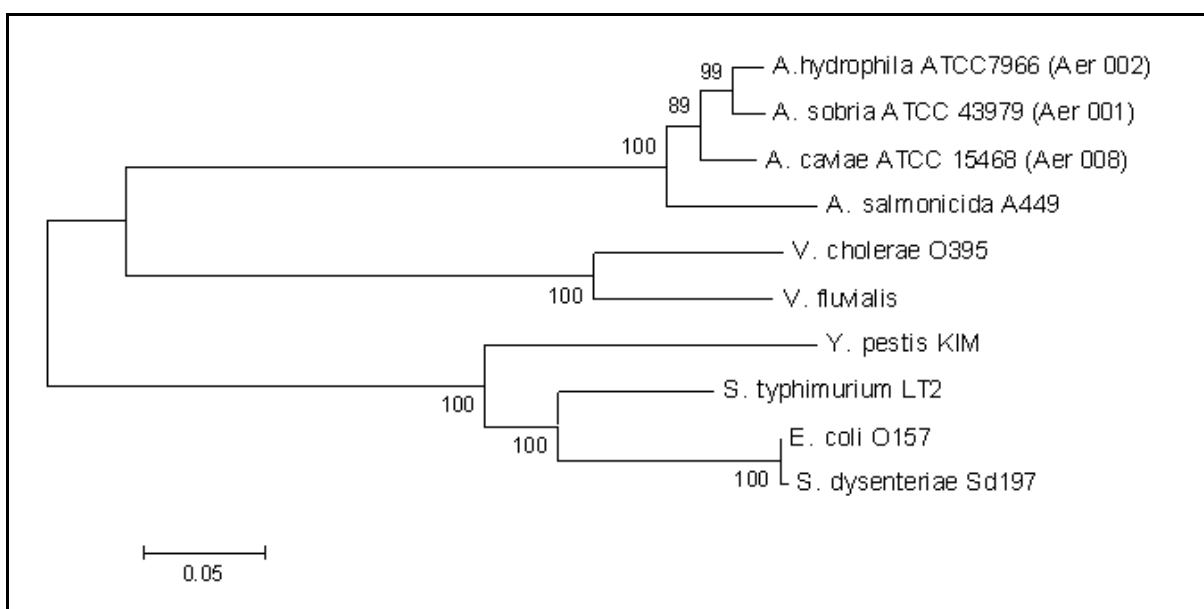


destas, 23 trocas de aminoácidos ocorrem somente nas comparações contra a seqüência de *A. salmonicida* A449.

**Quadro 6:** Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína OppA de *A. hydrophila* ATCC 7966 (IB Aer 002), *A. sobria* ATCC 43979 (IB Aer 001) e *A. caviae* ATCC 15468 (IB Aer 008) e *A. salmonicida* A449#.

|                      |  |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|----------------------|--|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|
|                      | *  | 20  | * | 40  | * | 60  | * | 80  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | M  | T   | H | K   | K | T   | M | I   | N | T | L | L | V | A | A | L | F | G | G | V | N | A | A | A | A | D | V | P | A | G | T | K | L | A | D | V | Q | L | V | K | G | N | G | S | E | P | A | T | L | D | P | H | K | T | E | G | T | V | E | S | N | I | L | R | D | L | F | E | G | L | V | A | S | G | P | K | G     | E     | : 80  |       |       |
| A. sob. (IBAer001) : | M  | T   | H | K   | K | T   | M | I   | N | T | L | L | V | A | A | L | F | G | G | V | N | A | A | A | A | A | D | V | P | A | G | T | K | L | A | D | V | Q | L | V | K | G | N | G | S | E | P | A | T | L | D | P | H | K | T | E | G | T | V | E | S | N | I | L | R | D | L | F | E | G | L | V | A | S | G | P | K     | G     | E     | : 80  |       |
| A. cav. (IBAer008) : | M  | T   | H | K   | K | T   | M | I   | N | T | L | L | V | A | A | L | F | G | G | V | N | A | A | A | A | A | D | V | P | A | G | T | K | L | A | D | V | Q | L | V | K | G | N | G | K | F | E | P | A | T | L | D | P | H | K | T | E | G | T | V | E | S | N | I | L | R | D | L | F | E | G | L | V | T | S | G | P     | K     | G     | E     | : 80  |
| A. sal. A449 :       | M  | T   | H | K   | K | T   | M | I   | N | T | L | L | V | A | A | L | F | G | G | M | N | A | A | A | A | A | D | V | P | A | G | T | K | L | S | D | V | Q | L | V | K | G | N | G | S | E | P | A | T | L | D | P | H | K | T | E | G | T | V | E | S | N | I | L | R | D | L | F | E | G | L | V | S | G | P | K | G     | E     | : 80  |       |       |
|                      | MTHKKTMINTLLVAALFGG6NAaAADVPAgTKLaDVQQLVKGngsEPATLDPHKTEGTVeSNIrDLFEGLV SGPKGE   |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|                      | *  | 100 | * | 120 | * | 140 | * | 160 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | V  | L   | E | A   | M | A   | E | S   | W | E | T | K | D | N | K | H | F | V | F | H | L | R | K | D | A | K | W | S | N | G | D | P | V | T | A | H | D | F | E | F | A | F | K | R | A | V | D | P | K | T | A | S | P | Y | S | W | Y | L | E | I | P | T | I | V | N | A | S | E | I | I | A | G | K | K | A | A | D     | T     | L     | G     | : 160 |
| A. sob. (IBAer001) : | V  | L   | E | A   | M | A   | E | S   | R | E | T | K | D | N | K | H | F | V | F | H | L | R | K | D | A | K | W | S | N | G | D | P | V | T | A | H | D | F | E | F | A | F | K | R | A | V | D | P | K | T | A | S | P | Y | S | W | Y | L | E | I | P | T | I | V | N | A | S | E | I | I | A | G | K | K | A | A | D     | T     | L     | G     | : 160 |
| A. cav. (IBAer008) : | T  | L   | E | G   | V | A   | E | S   | W | E | T | K | D | N | K | H | F | V | F | H | L | R | K | D | A | K | W | S | N | G | D | P | V | T | A | H | D | F | V | F | A | F | K | R | A | V | D | P | K | T | A | S | P | Y | S | W | Y | M | E | I | P | T | I | V | N | A | T | D | I | I | A | G | K | K | P | S | D     | T     | L     | G     | : 160 |
| A. sal. A449 :       | V  | L   | E | G   | V | A   | E | S   | W | E | T | K | D | N | K | H | F | V | F | H | L | R | K | D | A | K | W | S | N | G | D | P | V | T | A | H | D | F | E | F | A | F | K | R | A | V | D | P | K | T | G | S | P | Y | A | W | Y | M | E | I | P | T | I | V | N | A | T | E | I | I | A | G | K | K | P | S | D     | T     | L     | G     | : 160 |
|                      | LP 6AESwETKDNKh5VFHLRKDAKWSNGDPVTAHDfEFAfKRAVDPKTaSPYsWY6EIPTIVNA3eIIAGKK DTLG   |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|                      | *  | 180 | * | 200 | * | 220 | * | 240 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | V  | K   | A | V   | D | D   | T | F   | E | V | Q | L | E | K | A | V | P | F | V | S | M | L | S | H | T | T | T | P | V | P | K | K | V | I | E | K | F | G | D | K | T | Q | P | G | N | M | V | S | N | G | A | Y | V | L | K | D | W | V | V | N | E | R | V | D | V | E | R | N | P | N | Y | W | N | N | A | K | : 240 |       |       |       |       |
| A. sob. (IBAer001) : | V  | K   | A | V   | D | D   | T | F   | E | V | Q | L | E | K | A | V | P | F | V | S | M | L | S | H | T | T | T | P | V | P | K | K | V | I | E | K | F | G | D | K | T | Q | P | G | N | M | V | S | N | G | A | Y | V | L | K | D | W | V | V | N | E | R | V | D | V | E | R | N | P | N | Y | W | N | N | A | K | : 240 |       |       |       |       |
| A. cav. (IBAer008) : | V  | K   | A | V   | D | D   | H | T   | F | E | V | Q | L | E | K | A | V | P | F | V | S | M | L | S | H | T | T | T | P | V | P | K | K | V | I | E | K | F | G | D | K | T | Q | P | G | N | M | V | S | N | G | A | Y | V | L | K | D | W | V | V | N | E | R | V | D | V | E | R | N | P | N | Y | W | N | N | G | K     | : 240 |       |       |       |
| A. sal. A449 :       | V  | K   | A | V   | D | D   | T | F   | E | V | Q | L | E | K | A | I | P | F | V | S | M | L | S | H | T | T | T | P | V | P | K | K | V | I | E | K | F | G | D | K | T | Q | P | G | N | M | V | S | N | G | A | Y | V | L | K | D | W | V | V | N | E | R | V | D | I | E | R | N | E | K | Y | W | N | N | A | K | : 240 |       |       |       |       |
|                      | VKAVDDyTFEVQLEKA6PYFVSMLSHTTTYPVPKKVIeKfGDKwTQPGNMVSNgAYvLKDWVVNERVD6ERNPnYwNnAk |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|                      | *  | 260 | * | 280 | * | 300 | * | 320 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | T  | V   | I | N   | K | V   | T | L   | P | I | Q | S | T | N | A | E | L | N | R | Y | L | A | G | E | V | D | L | T | Y | N | M | P | I | E | R | F | K | Q | M | K | K | L | P | N | E | V | K | V | S | G | Y | V | G | T | Y | Y | Y | Q | Y | N | F | K | K | P | F | D | D | V | R | V | R | T | A | L | S | Y | A     | : 320 |       |       |       |
| A. sob. (IBAer001) : | T  | V   | I | N   | K | V   | T | L   | P | I | Q | S | T | N | A | E | L | N | R | Y | L | A | G | E | V | D | L | T | Y | N | M | P | I | E | R | F | K | Q | M | K | K | L | P | N | E | V | K | V | S | G | Y | V | G | T | Y | Y | Y | Q | Y | N | F | K | K | P | F | D | D | V | R | V | R | T | A | L | S | Y | A     | : 320 |       |       |       |
| A. cav. (IBAer008) : | T  | V   | I | N   | K | V   | T | L   | P | I | Q | S | T | N | A | E | L | N | R | Y | L | A | G | E | V | D | L | T | Y | N | M | P | I | E | R | F | K | Q | M | K | K | L | P | N | E | V | K | V | S | G | Y | V | G | T | Y | Y | Y | Q | Y | N | F | K | K | P | F | D | D | V | R | V | R | T | A | L | S | Y | A     | : 320 |       |       |       |
| A. sal. A449 :       | T  | V   | I | D   | K | V   | S | Y   | L | P | I | Q | S | T | N | A | E | L | N | R | Y | L | A | G | E | L | D | L | T | Y | N | M | P | I | E | R | F | K | Q | M | K | K | L | P | N | E | V | K | V | S | G | Y | V | G | T | Y | Y | Y | T | F | N | T | R | K | P | Y | D | D | V | R | V | R | T | A | L | T | Y     | A     | : 320 |       |       |
|                      | TVI1kV3YLPIQSTNAELNRYLAGE6DLTYNMPiERfKQMKKeLp1EVkVSGYVGTYYYq5NfKhkP5DDVRVRTAL3YA |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|                      | *  | 340 | * | 360 | * | 380 | * | 400 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | I  | D   | R | N   | V | I   | A | D   | K | V | M | G | K | G | E | T | P | G | Y | T | L | V | P | D | F | V | D | G | F | K | P | V | A | P | A | W | S | K | L | T | Q | A | E | R | D | A | K | A | K | E | L | L | T | E | A | G | F | G | P | G | K | P | L | K | F | E | L | L | Y | N | T | D | D | N | H | K | K     | V     | A     | V     | : 400 |
| A. sob. (IBAer001) : | I  | D   | R | N   | V | I   | A | D   | K | V | M | G | K | G | E | T | P | G | Y | T | L | V | P | D | F | V | D | G | F | K | P | V | A | P | A | W | S | K | L | T | Q | A | E | R | D | A | K | A | K | E | L | L | T | E | A | G | F | G | P | G | K | P | L | K | F | E | L | L | Y | N | T | D | D | N | H | K | K     | V     | A     | V     | : 400 |
| A. cav. (IBAer008) : | I  | D   | R | N   | V | I   | A | D   | K | V | M | G | K | G | E | T | P | G | Y | T | L | V | P | D | F | V | D | G | F | K | P | V | A | P | A | W | S | K | L | T | Q | A | E | R | D | A | K | A | K | E | L | L | T | E | A | G | Y | G | P | G | K | P | L | K | F | E | L | L | Y | N | T | D | D | N | H | K | K     | V     | A     | G     | : 400 |
| A. sal. A449 :       | I  | D   | R | D   | V | I   | A | D   | K | V | M | G | K | G | E | T | P | G | Y | T | L | V | P | D | F | V | D | G | F | K | P | V | A | P | A | W | S | K | L | T | Q | A | E | R | T | K | A | A | A | M | I | Q | E | A | G | Y | G | E | D | N | P | L | K | F | E | L | L | Y | N | T | D | D | N | H | K | K | V     | A     | V     | : 400 |       |
|                      | IDR1VIADKVMGKGETPGYtLVpDFVDGfKpVAPaWSKLTQAErDaKaKe6LteAG5GpGkPLKFELLYNTDDNHKKVAv |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|                      | *  | 420 | * | 440 | * | 460 | * | 480 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | A  | V   | A | S   | M | W   | K | L   | G | V | Q | V | S | L | V | N | Q | E | W | K | T | Y | L | E | T | N | K | Q | Q | F | D | V | G | R | A | G | W | I | A | D | Y | N | E | A | S | S | M | L | D | L | M | Q | T | H | G | N | N | D | G | K | Y | S | N | P | E | F | D | K | L | M | D | S | S | R | D | Q | V     | : 480 |       |       |       |
| A. sob. (IBAer001) : | A  | V   | A | S   | M | W   | K | L   | G | V | Q | V | S | L | V | N | Q | E | W | K | T | Y | L | E | T | N | K | Q | Q | F | D | V | G | R | A | G | W | I | A | D | Y | N | E | A | S | S | M | L | D | L | M | Q | T | H | G | N | N | D | G | K | Y | S | N | P | E | F | D | K | L | M | D | S | S | R | D | Q | V     | : 480 |       |       |       |
| A. cav. (IBAer008) : | A  | V   | A | S   | M | W   | K | L   | G | V | Q | V | S | L | V | N | Q | E | W | K | T | N | L | E | T | N | K | Q | Q | F | D | V | G | R | A | G | W | I | A | D | Y | N | E | A | S | S | M | L | D | L | M | Q | T | H | G | N | N | D | G | K | Y | S | N | P | E | F | D | K | L | M | D | S | S | R | D | Q | V     | : 480 |       |       |       |
| A. sal. A449 :       | A  | V   | A | S   | M | W   | K | L   | G | V | Q | V | S | L | V | N | Q | E | W | K | T | Y | L | E | T | N | K | Q | Q | F | D | V | A | R | R | G | W | I | A | D | Y | N | E | A | S | S | M | L | D | L | M | Q | T | H | G | N | N | D | G | K | Y | S | N | P | V | F | D | K | L | M | D | S | S | R | D | Q | V     | : 480 |       |       |       |
|                      | AVASMWKkLGVQVSLVNQEWKTyLET KQqQFDVgRaGwIADYNEASSMLDLMQTTHGNNDGKYsNpFDKLM1SR1QV   |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
|                      | *  | 500 | * | 520 | * | 540 |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |
| A. hyd. (IBAer002) : | D  | A   | D | A   | R | N   | K | L   | Y | V | Q | A | E | E | I | L | A | K | D | M | P | I | A | P | I | Y | Q | V | T | S | R | M | V | K | S | Y | V | G | G | P | A | N | P | L | D | N | L | Y | S | K | D | M | Y | I | I | A | H |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |       |       |       |       |

A diferença no número de trocas de aminoácidos encontrado em *A. salmonicida* A449 a partir do alinhamento da seqüência de aminoácidos realizado através do programa GeneDoc, corrobora os dados obtidos através do dendrograma de seqüência protéica (Figura 13), baseado na seqüência protéica resultante do seqüenciamento do gene *oppA*, no qual se observou a distância da cepa *A. salmonicida* A449 em relação as espécies de *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*, as quais estão mais intimamente correlacionadas.



**Figura 13.** Dendrograma baseado no alinhamento de seqüência protéica OppA. O Dendrograma foi calculado utilizando algoritmo Neighbor-joining e bootstrap (100 replicas). Distâncias “Maximum Composite Likelihood”.

Além destas três espécies, foi possível seqüenciar uma região central do gene *oppA* de 406 pb (posição 395 a 800 do gene *oppA* da seqüência nucleotídica de *A. hydrophila* ATCC7966 IB Aer 002) em doze amostras de *Aeromonas*, correspondente a nove espécies

(Quadro 7). Esta região central do gene, corresponde aos resíduos 108 a 242 da proteína OppA madura, os quais fazem parte do domínio I e II.

**Quadro 7.** Alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *oppA*, correspondente a região central do gene (posição 395 a 800) de diferentes espécies de *Aeromonas*\* seqüenciadas e a mesma região correspondente da espécie *A. salmonicida* A449#.

|                  |   |   |     |     |     |   |     |   |     |  |
|------------------|---|---|-----|-----|-----|---|-----|---|-----|--|
|                  |   | *   | 20  | *   | 40  | * | 60  | * | 80  |  |
| A. hyd. (Aer002) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATCGTCAATGCCAGCGAGATCATCGGCGGCAAGAAAGCGGCCGACACC      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. sob. (Aer001) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATCGTCAATGCCAGCGAGATCATCGGCGGCAAGAAAGCGGCCGACACC      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. cav. (Aer008) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATCGTCAACGCCACTGACATCATCGGCGGCAAGAAAGCGGTCGACACC      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. med. (Aer004) | : | CTCCTTACTCCTGGTACATGGAGATCCCGACCATCACGAATGGGACCGACATCATCGGTGGCAAGAAAACGGGCCGACACC     | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. ich. (Aer003) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATCGTCAACGCCACTGACATCATCGGCGGCAAGAAAGCGGTCGATAAG      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. tro. (Aer011) | : | CTCCCGACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATCGTCAACGCCCTCCGACATCATCGGTGGCAAGAAAGCGGCCGACACC     | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. enc. (Aer014) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACTATCGTCAACGCCCTCCGACATCATCGGTGGCAAGAAAGCGGTCGACACC     | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. all. (Aer017) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACTATCGTCAACGCCCTCCGACATCATCGGTGGCAAGAAAGCGGTCGACACC     | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer013) | : | CTCCTTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATTGCCAATGCCCTCCGAGATCATCGGAGGTAAAAAGCGGCTGATAAG      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer006) | : | CTCCCTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATTGCCAATGCCCTCCGAGATCATCGGAGGTAAAAAGCGGCTGATAAG      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. euc. (Aer016) | : | CTCCTTACTCCTGGTATCTGGAGATCCCGACCATTGCCAATGCCCTCCGAGATCATCGGAGGTAAAAAGCGGCTGAAAAG      | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
| A. sal. A449     | : | CTCCCTTATGCCCTGGTACATGGAGATCCCGACCATACTCAACGCCACTCCGAGATCATCGGCGGCAAGAAAGCGGCTAGATAAG | :   | 80  |     |   |     |   |     |  |
|                  |   | CTCC tActCCTGGTA tGGAGATCCCGAccAT g cAA GCc ccGA ATCATcGc GGcAAGAgCg C GA AC          |     |     |     |   |     |   |     |  |
|                  |   | *   | 100 | *   | 120 | * | 140 | * | 160 |  |
| A. hyd. (Aer002) | : | CTGGGCGTGAAAGCAGTGGACGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGGTGCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. sob. (Aer001) | : | CTGGGCGTGAAAGCAGTGGACGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGGTGCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. cav. (Aer008) | : | CTGGGCGTGAAAGCGGTGGACGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGGTGCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. med. (Aer004) | : | CTGGGCGTGAAAGCCAGCGACGACTACACCTTCGAAAGTGCAGGTTGAAAGGGCGGTGCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC     | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. ich. (Aer003) | : | CTGGGCGTGAAAGCGACCGACGACTACACCTTCGAAAGTGCAGGTTGAAAGGGCGGTGCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC     | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. tro. (Aer011) | : | CTGGGCGTGAAAGCGGTTCGATGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGATCCCTACTTTGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. enc. (Aer014) | : | CTGGGCGTGAAAGCGGTTCGATGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGATCCCTACTTTGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. all. (Aer017) | : | CTGGGCGTGAAAGCGGTTCGATGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGATCCCTACTTTGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer007) | : | CTGGGCGTGAAAGCGGTTCGATGACTACACCTTCGAGGTGCAAGTGGAAAGGGCGGTGCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC     | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer013) | : | CTGGGCGTGAAAGCGACCGACGACTACACCTTCGAAAGTGCAGGTTGAAAGGGCGATCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer006) | : | CTGGGCGTGAAAGCGACCGACGACTACACCTTCGAAAGTGCAGGTTGAAAGGGCGATCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. euc. (Aer016) | : | CTGGGCGTGAAAGCGACCGACGACTACACCTTCGAAAGTGCAGGTTGAAAGGGCGATCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
| A. sal. A449     | : | CTGGGCGTGAAAGCGCTCGACGACTACACCTTCGAAAGTGCAGGTTGAAAGGGCGATCCCTACTTCGTGAGCATGCTCTC      | :   | 160 |     |   |     |   |     |  |
|                  |   | cTGGG GTGAAgGC GAcGActAcACCTTCGA GTGCAgctF GAgAA GCG T CctTACTTCgTCAGCATGCTCTC        |     |     |     |   |     |   |     |  |
|                  |   | *   | 180 | *   | 200 | * | 220 | * | 240 |  |
| A. hyd. (Aer002) | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. sob. (Aer001) | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. cav. (Aer008) | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. med. (Aer004) | : | TCATACCACCACCTATCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTTGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTTT      | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. ich. (Aer003) | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTTGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT      | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. tro. (Aer011) | : | CCACACCACCACCTATCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTTGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT      | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. enc. (Aer014) | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTTGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT      | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. all. (Aer017) | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTTGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT      | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer007) | : | CCACACCACCACCTATCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer013) | : | CCACACCACCACCTATCCGGTACCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. hyd. (Aer006) | : | CCACACCACCACCTATCCGGTACCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. euc. (Aer016) | : | CCACACCACCACCTATCCGGTACCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTCCGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT     | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
| A. sal. A449     | : | CCACACCACCACCTACCCGGTGCCGAAGAAGGTGATCGAGAAGTTTGGTGACAAGTGGACCCAGCCCCGCAACATGGTAT      | :   | 240 |     |   |     |   |     |  |
|                  |   | cCAcACCACCACCTA CCGGT CCgAAGAAGTg TCGAGAAGTT GGTGAcAAGtGGACCCAGCC G AA ATGGT T        |     |     |     |   |     |   |     |  |

```

*      260      *      280      *      300      *      320
A.hyd. (Aer002) : CCAACGGTGCCTATGTGCTGAAGGATTTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCACGTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAC : 320
A.sob. (Aer001) : CCAACGGTGCCTATGTGCTGAAGGATTTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCACGTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAC : 320
A.cav. (Aer008) : CCAACGGTGCCTATCGTGCTGAAGGACTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCACGTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAT : 320
A.med. (Aer004) : CCAACGGTGCCTATGTGCTGAAGGATTTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCACGTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAT : 320
A.ich. (Aer003) : CCAACGGTGCCTATGTCTGAAGAGCTGGGTGGTGAACGAGCGCGTGCACGTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAT : 320
A.tro. (Aer011) : CCAACGGTGCCTATGTGCTGAAGACTGGGTGGTGAACGAGCGCGTGCATGTGAGCGCAACAAAACTACTGGAAACAC : 320
A.enc. (Aer014) : CCAACGGTGCCTATGTGCTGAAGACTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCATGTGAGCGCAACAAAACTACTGGAAACAC : 320
A.all. (Aer017) : CCAACGGTGCCTATGTGCTGAAGAACTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCATGTGAGCGCAACAAAACTACTGGAAACAT : 320
A.hyd. (Aer007) : CCAACGGTGCCTATCGTGCTGAAGGACTGGGTGGTCAACGAGCGCGTGCACGTCGAGCGCAACCCGAACTACTGGAAACAT : 320
A.hyd. (Aer013) : CCAACGGTGCCTATACCTGAAGAACTGGGTGGTGAACGAGCGCGTGCAGAGTGGAGCGCAACAGCACTACTGGAAACAT : 320
A.hyd. (Aer006) : CCAACGGTGCCTATACCTGAAGAACTGGGTGGTGAACGAGCGCGTGCAGAGTGGAGCGCAACAGCACTACTGGAAACAT : 320
A.euc. (Aer016) : CCAACGGTGCCTATACCTGAAGAACTGGGTGGTGAACGAGCGCGTGCAGAGTGGAGCGCAACAGCACTACTGGAAACAT : 320
A.sal.A449 : CCAACGGTGCCTATCCAACTGAAGACTGGGTGGTGAACGAGCGCGTGCATATCGAGCGCAACCCCACTACTGGGGCAAC : 320
CCAACGGTGCCTAT CTGAA acTGGGTgGT AACGAGCGCGTcGA gT GAgCGCAAC acTACTGGaaC A

```

```

*      340      *      360      *      380      *      400
A.hyd. (Aer002) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.sob. (Aer001) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.cav. (Aer008) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.med. (Aer004) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.ich. (Aer003) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.tro. (Aer011) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.enc. (Aer014) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.all. (Aer017) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAATGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.hyd. (Aer007) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACCTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.hyd. (Aer013) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.hyd. (Aer006) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGTGAACCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.euc. (Aer016) : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGCTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
A.sal.A449 : GCCAAGACCGTATCAACAAGGTGACTATCTGCCGATCCAGTCCACCAACCGCGAGTGAACCGCTACTGGGTGGCGA : 400
G CAAGAccGTcATCaAcAAGGTG CTATCTGCC ATCCAGTc ACCAACCGcGA TGA CCGCTATcTGGC GG GA

```

```

A.hyd. (Aer002) : AGTGGG : 406
A.sob. (Aer001) : AGTGGG : 406
A.cav. (Aer008) : AGTGGG : 406
A.med. (Aer004) : AGTGGG : 406
A.ich. (Aer003) : AGTGGG : 406
A.tro. (Aer011) : AGTGGG : 406
A.enc. (Aer014) : AGTGGG : 406
A.all. (Aer017) : AGTGGG : 406
A.hyd. (Aer007) : AGTGGG : 406
A.hyd. (Aer013) : AGTGGG : 406
A.hyd. (Aer006) : AGTGGG : 406
A.euc. (Aer016) : AGTGGG : 406
A.sal.A449 : GCTGGG : 406
agTGGG

```

\*. *A. hydrophila* ATCC 7966 (Aer 002); *A. sobria* ATCC 43979 (Aer 001); *A. caviae* ATCC 15468 (Aer 008); *A. media* ATCC 33907 (Aer 004); *A. ichthiosmia* ATCC 49904 (Aer 003); *A. trota* ATCC 49657 (Aer 011); *A. encheleia* CECT 4341 (Aer 014); *A. allosaccharophila* ATCC 51208 (Aer 017); *A. hydrophila* NCBI 9233 (Aer 007); *A. hydrophila* CCT 191 (Aer 013); *A. hydrophila punctata* ATCC 14486 (Aer 006); *A. eucrenophila* ATCC 23309 (Aer 016); *A. salmonicida* A449.

#. Em vermelho as seqüências com 100% de identidade, em azul estão às seqüências com até 75% de identidade e em amarelo estão indicadas às seqüências com até 50% de identidade.

Conforme pode ser apreciado no Quadro 7, esta região apresenta alto grau de homologia entre as diferentes espécies do gênero *Aeromonas* avaliadas. Neste sentido, 71,7% dos nucleotídios são idênticos em todas as espécies de *Aeromonas*, 14,5% apresentam mais de

75% de conservação e 12,8% exibem mais de 50% de homologia. Apenas quatro posições 59, 290, 356 e 395, correspondentes aos nucleotídios 453, 684, 750 e 789 da sequência do gene *oppA* de *A. hydrophila*, apresentam baixo nível de conservação (<50%). Apesar de não existir uma região altamente variável, a parte inicial destas sequências (resíduos 35 a 137) é a menos conservada do que a região central.

As seqüências nucleotídicas de 406 pb de diferentes espécies de *Aeromonas* foram comparadas com a seqüência correspondente das espécies *A. salmonicida* A449, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. typhimurium* e *Y. pestis*. O dendrograma construído a partir do alinhamento nucleotídico é mostrado na Figura 14.

Análise da seqüência *oppA* mostra algumas divergências entre todas as espécies de *Aeromonas*. Por exemplo, *A. trota* e *A. caviae* são separadas, a uma distância filogenética relativamente grande (Figura 14), este dado concorda com Yáñez *et al.* (2003) com um estudo filogenético baseado em seqüência do gene *gyrB*, e discorda do estudo baseado em 16s rDNA (Martínez-Murcia, *et al.*, 1992).

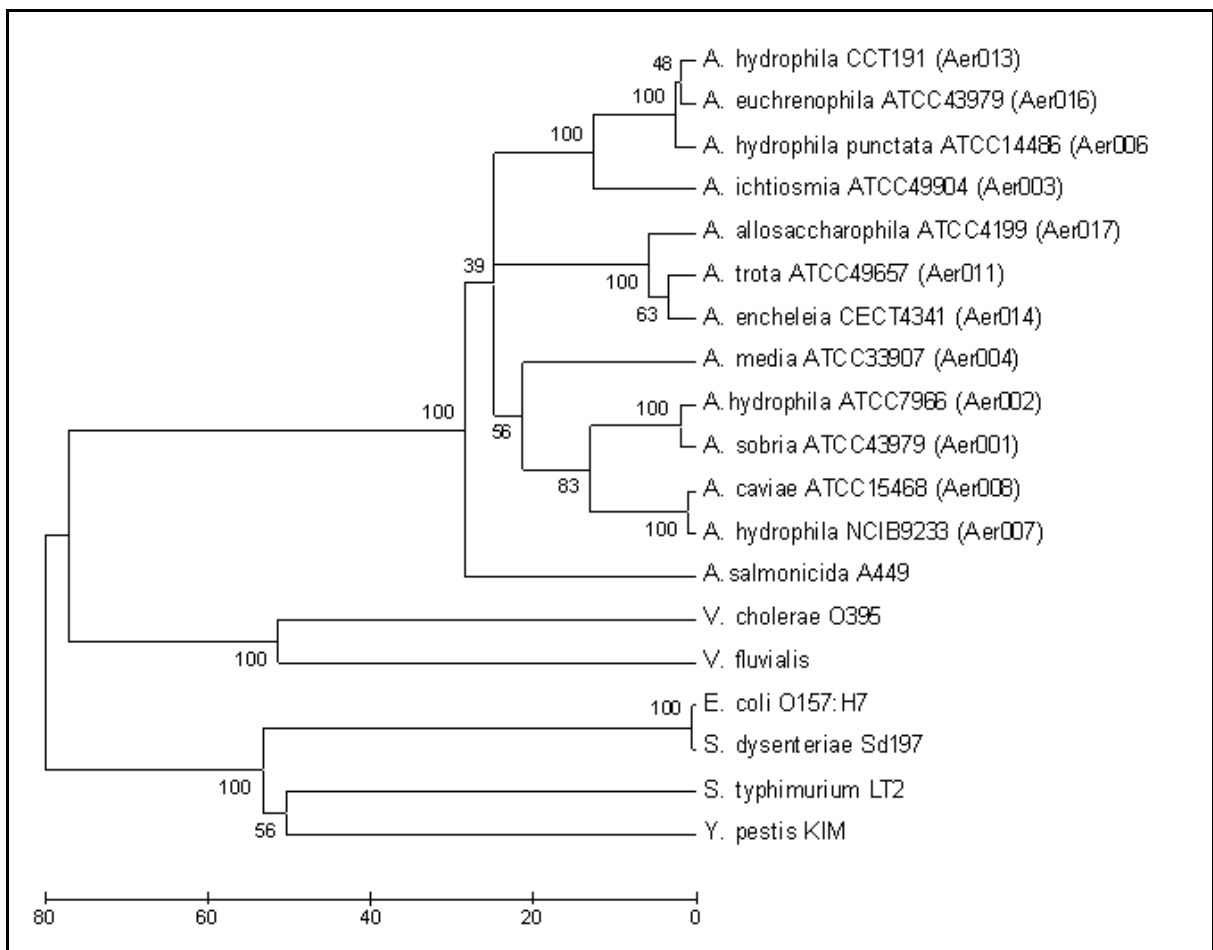
A seqüência *oppA* de *A. hydrophila* ATCC 7966 e a seqüência de *A. sobria* ATCC 43979, indicam que estas espécies estão intimamente relacionadas. Por outro lado, *A. eucrenophila* e *A. sobria* separam-se claramente com base na seqüência *oppA*, concordando com alinhamento de seqüência 16s rDNA (Martínez-Murcia, *et al.*, 1992), entretanto, difere da análise de seqüência do gene *gyrB* (Yáñez *et al.*, 2003).

A espécie *A. salmonicida* mostra-se distinta do restante das *Aeromonas*, como já descrito com base na Figura 12, 13 e 14.

Quatro linhagens diferentes de *A. hydrophila* foram avaliadas (ATCC 7966-Aer 002; ATCC 14486-Aer 006; NCBI 9233-Aer 007; CCT 191-Aer 013), sendo que ATCC 7966 e

NCBI 9233 apresentam-se relacionadas, da mesma forma que as linhagens ATCC 14486 e CCT 191 (Figura 14).

De um modo geral estes dados comprovam a elevada conservação do gene *oppA* em bactérias Gram-negativas, e particularmente dentro de *Aeromonas*.



**Figura 14.** Dendrograma baseado no alinhamento de uma sequência de 406 pb (aprox. posições 398 a 805 do gene *oppA* da sequência de *A. hydrophila* ATCC7966 – Aer002). O Dendrograma foi calculado utilizando algoritmo Neighbor-joining e bootstrap (100 replicas). Distâncias “número de diferenças”.

O baixo número de diferenças entre as OppAs das quatro *Aeromonas*, associado à elevada positividade ou similaridade (>95%) e a ausência de alterações nos resíduos considerados mais importantes na interação OppA/ligante (item 4.1.6 desta dissertação) permitem concluir que as OppAs de *Aeromonas* apresentam estrutura tridimensional, atividade e especificidade muito semelhantes.

## 5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos durante a realização desse trabalho chegamos as seguintes conclusões:

1. Apenas um operon de transporte de oligopeptídios, formado por cinco genes *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*, foi evidenciado nos genomas de *A. hydrophila* ATCC7966 e *A. salmonicida* A449. A constituição, disposição e tamanho dos cinco genes do operon é semelhante aquela de outras espécies de bactérias Gram-negativas.
2. Além do gene *oppA*, sete e oito genes de proteínas de ligação a oligopeptídios foram identificados nos genomas de *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, respectivamente. Estes genes foram caracterizados como “murein binding proteins” e “soluble binding proteins” e encontram-se em operons formados por um a cinco genes.
3. As proteínas OppAs de *A. hydrophila* e *A. salmonicida* exibiram elevada identidade e similariedade com as ortólogas de *Vibrio* e Enterobacteriaceas. A maior diferença evidenciada na composição de aminoácidos corresponde à ausência de duas cisteínas nas OppAs de *Aeromonas*.
4. Análise “in silico” da estrutura tridimensional da OppA de *A. hydrophila* permitiu comprovar a estrutura típica “Venus flytrap” desta família. A OppA apresentou três



domínios com elevada conservação naqueles resíduos considerados essenciais na interação proteína/ligante.

5. A identificação através de “Western blot” das proteínas periplásmicas OppA (57,8kDa) em distintas espécies de *Aeromonas* utilizando anticorpo contra OppA de *E. coli* confirma a elevada semelhança entre as proteínas de ligação a peptídios entre bactérias Gram-negativas.
6. A presença do gene *oppA* foi evidenciada, através de PCR, em todas as espécies e linhagens de *Aeromonas*.
7. A comparação das seqüências completas dos gene *oppA* e proteínas OppA de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* e *A. salmonicida* permitiu evidenciar baixo número de diferenças em nível gênico e protéico, o que associado à elevada similaridade (>95%) e a ausência de alterações nos resíduos considerados mais importantes na interação OppA/ligante, permitem concluir que as OppAs de *Aeromonas* apresentam estrutura tridimensional, atividade e especificidade muito semelhantes.
8. A comparação das sequências completas e parciais do gene *oppA* de *Aeromonas*, vibrios e enterobactérias corrobora a existência da família Aeromonadaceae, assim como várias das relações filogenéticas previamente estabelecidas por seqüenciamento dos genes 16S rDNA e *gyrB* dentro gênero *Aeromonas*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Abeyta Júnior, C.; Kaysner, C.A.; Wekell, M.M. (1990). Incidence of motile *Aeromonas* from United States west coast shellfish growing estuaries. **J. Food Protection.** 53: 849-855.
- Al-Benwan, K.; Abbott, S.; Janda, J.M.; Huys, G.; 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.
- 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 7<sup>th</sup>, American Society for Microbiology. p. 507 – 516.
- Amaral, L.A.; Rossi Júnior, O.D.; Nader Filho, A.; Barros, L.S.S.; Silveiras, P.M. (2006). Água utilizada em propriedades rurais para o consumo humano e na produção de leite como veículo de bactérias do gênero *Aeromonas*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.** 101: 103-107.

- Araújo, R.M.; Arribas, R.M.; Lucena, F. (1989). Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. **J. Appl. Bacteriol.** 67: 213-217.
- Aslani, M.M.; Hamzeh, H.S. (2004). Characterization and Distribution of Virulence Factors in *Aeromonas hydrophila* Strains Isolated from Fecal Samples of Diarrheal and Asymptomatic Healthy Persons, in Ham, Iran. **Iranian Biomedical Journal.** 8: 199-203.
- Balan, A.; Souza, C.S.; Ferreira, R.C.C.; Ferreira, L.C.S. (2008). Production of the refolded oligopeptide-binding protein (OppA) encoded by the citrus pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. **Genetics and Molecular Research.** 7: 117-126.
- 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*. **Ciência Animal Brasileira.** 4: 69-83.
- Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M. K.; Poolman, B. (2006) ABC Transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. **FEBS Letters.** 580: 1023-1035.
- 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. Microbiology.** 32:334-339.
- Borezee, E.; Pellegrini, E.; Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an Oligopeptide-Binding Protein Required for Bacterial Growth at Low Temperature and Involved in Intracellular Survival. **Infection and Immunity.** 68: 7069-7077.
- 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.
- Buchanan, R.L.; Palumbo, S.A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Safet .** 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.** v. 54 (n.3.).
- Burke, M. A.; Ardehali, H. (2007) Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. **Translational Research.** 150: 73-80.
- Burke, V.; Gracey, J.; Robinson, D.; Peck, D.; Beaman, J.; Bundell, C. (1983). The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* espécies and other injective agents. **J. Infect. Dis.** 148:6874.
- 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.
- Canals, R.; Jiménez, N.; Vilches, S.; Regué, M.; Merino, S.; Tomás, J.M. (2007). Role of flagellin and galactose in the virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O34. **J. Bacteriol.** 189: 540-550.
- Carli, A. (2006). Resistência a antibióticos e presença de b-lactamases de espectro expandido (ESBLs) em *Aeromonas*. **Dissertação de Mestrado.** Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- 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.
- Carneiro, M.S.; Rossi Júnior, O.D. (2006). Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol.** 73: 271-276.
- 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 hydrophila*. **Infect. Immun.** 68: 3233-2341.

- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M.J.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Hernández-Rendón, E.; Aparício, G.O.; Guarro, J. Chacón, M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. Isolated from Frozen Fish Intended for Human Consumption in México. **International Journal of Food Microbiology**. 84: 41-49.
- 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**. 84: 269-278.
- 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.
- Costa, F.N.; Rossi Júnior, O.D. (2002) Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 54: 534-535.
- Costa, F.N.; Rossi Júnior, O.D.; Amaral, L.A. (2003). Ação de antimicrobianos sobre estirpes de *Aeromonas*. **RPV**. 98: 95-99.
- Cundell, D.R.; Pearce, B.J.; Sandros, J.; Naughton, A.M.; Masure, H.R. (1995). Peptide permease from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. **Infect. Immun**. 63: 2493-2498.
- Daily, O.P.; Joseph, S.W.; Coobaugh, J.C.; Walker, R.I.; Merrel, B.R.; Rollins, D.M.; Seidler, R.J.; Colwell, R.R.; Lissner, C.R. (1981). Association of *A. sobria* with human infection. **J. Clin. Microbiol**. 13:769-777.
- Dassa, E. (2000). ABC transport. New York, USA: Academic Press. p.1-12.
- Dassa, E., Bouige, P. (2001) The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in Microbiology**. 152: 211-229.
- Dawson, R. J. P.; Locher, K. P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporters. **Nature**. 443: 180-185.

- 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.
- Deng, W.; Burland, V.; Plunkett III, G.; Boutin, A.; Mayhew, G. F.; Liss, P.; Perna, N. T.; Rose, D. J.; Mau, B.; Zhou, S.; Schwartz, D. C.; Fetherston, J. D.; Lindler, L. E.; Brubaker, R. R.; Plano, G. V.; Straley, S. C.; MsDonough, K. A.; Nilles, M. L.; Matson, J. S.; Blattner, F. R.; Perry, R. D. (2002). Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. **J. Bacteriol.** 184: 4601-4611.
- Detmers, F.J.M.; Lanfermeijer, F.C.; Poolman, B. (2001). Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. **Res. Microbiol.** 152: 245-258.
- 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.
- 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,
- Fadanelli, R. (2005). Prevalência de genes relacionados com a patogenicidade e produção de enzimas extracelulares em *Aeromonas* sp. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.
- Fuzihara T.O.; Murakami, K.A.; Vannucci, L. (1995). *Aeromonas hydrophila*: ocorrência em água de consumo humano. In: XVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Resumos**. p 28. Santos.
- Garmory, H. S., Titball, R. W. (2004) ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. **Infection and Immunity.** 72: 6757-6763.

- Ghenghesh, K.S.; El-Ghodban, A.; Dkakni, R.; Abeid, S.; Altomi, A.; Tarkumi, A.; Marialigeti, K. (2001). Prevalence, Species Differentiation, Haemolytic Activity, and Antibiotic Susceptibility of *Aeromonas* in Untreated Well Water. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96: 169-173.
- Goñi-Urriza, M.; Capdepuuy, M.; Arpin, C.; Raymond, N.; Caumette, P.; Quentin, C. (2000a). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 125-132.
- Goñi-Urriza, M.; Pineau, L.; Capdepuuy, M.; Roques, C.; Caumette, P.; Quentin, C. (2000b). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. **J. Antimicrob. Chemother.** 46: 297-301.
- Goodell, E.W.; Higgins, C. F. (1987). Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 169: 3861-3865.
- Guerra, I. (2001). Prevalência de *Aeromonas* em pacientes hospitalizados com diarreia. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- 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. Microbiol.** 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.
- Harf-Monteil, C.; Flèche, A.L.; Prévost, G.; Bermond, D.; Grimont, P.A.D.; Monteil, H. (2004). *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **Inter. J. Syst. Evolut. Microbiol.** 54:481-485.

- Harland, D.N.; Dassa, E.; Titball, R.W.; Brown, K.A.; Atkins, H.S. (2007). ATP-binding cassette systems in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **BMC Genomics**. 8: 83-91.
- Harland, D.N.; Garmory, H.S.; Brown, K.A.; Titball, R.W. (2005). An association between ATP binding cassette systems, genome sizes and lifestyles of bacteria. **Research in Microbiology**. 156: 434-442.
- Harlow, Ed.; Lane, D. (1988). **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Higgins, C.; Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**. 11: 918 – 926.
- Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**. 152: 205-210.
- Higgins, C.F.; Hardie, M.M.; Jamieson, D.; Powell, L.M. (1983). Genetic map of the opp (oligopeptide permease) locus of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 153: 830-836.
- Hilles I.D.; Higgins C.F. (1986). Peptide uptake by *Salmonella typhimurium* the periplasmatic oligopeptide-binding protein. **Eur. J. Biochem.** 158: 561-567.
- Hiron, A.; Borezée-Durant, E.; Piard, J.; Juillard, V. (2007). Only One of Four Oligopeptide Transport Systems Mediates Nitrogen Nutrition in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. 189: 5119-5129.
- Hollenstein, K.; Dawson, R.J.P.; Locher, K.P. (2007a). Structure and mechanism of ABC transporters proteins. **Current Opinion in Structural Biology**. 17: 1-7.
- Hollenstein, K.; Frei, D.C.; Locher, K.P. (2007b). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**. 446: 213-216.
- 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.
- Huddleston, J.R.; Zak, J.C.; Jeter, R.M. (2006). Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental Sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 7036-7042.
- Janda, J.M.; Abbott, S.L.; Morris, J.G. (1995). *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella* In: Blaser, M.J.; Smith, P.D.; Ravdin, J.I.; Greenberg, H.B.; Guerrant, R.L. **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press. p. 905-917.
- 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.
- Jangid, K.; Kong, R.; Patole, M.S.; Shouche, Y.S. (2007). LuxRI homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. **BMC Microbiology.** 7: 1-11.
- Jones, P.M.; George, A.M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. **CMLS.** 61: 682-699.
- Joseph, S.W.; Carnahan, A.M. (2000). Update on the Genus *Aeromonas*. **ASM News.** 66:218-221.
- Kirov, S.M.; Anderstani, E.K.; Hayward, L.J. (1993a). The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. **Int. J. Food Microbiol.**, 20:159-168.
- Kirov, S.M.; Hui, D.S.; Hayward, L.J.(1993b). Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **J. Food. Protection.**56:306-312.
- 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.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Lazazzera, B.A.; Solomon, J.M.; Grossman, A.D. (1997). An exported peptide functions

- intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. **Cell**. 89: 917-925.
- Lee E.; Ahn S.; Park J.; Lee J.; Ahn S.; Kong I. (2004). Identification of oligopeptide permease (opp) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by oppA knockout mutation. **FEMS Microbiol Lett**. 240: 21–30.
- Leonard, B.A.B.; Podbielski, A.; Hedberg, P.J.; Dunny, G.M. (1996). *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease systems to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 260-264.
- Levdikov, V.M.; Blagova, E.V.; Brannigan, J.A.; Wright, L.; Vagin, A.A.; Wilkinson, A.J. (2005). The structure of the oligopeptide-binding Protein, AppA, from *Bacillus subtilis* in complex with a nonapeptide. **J. Mol. Biol.** 345: 879-892.
- Linton K.J.; Higgins C.F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Molecular Microbiology** 28: 5–13.
- Linton, K J.; Higgins, C.F. (2007). Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**. 453: 555-567.
- Lu, G.; Westbrook, J.M.; Davidson, A.L.; Chen, J. (2005). ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. **Biophysics**. 102: 17969-17974.
- Majeed, K.N.; Egan, A.F.; Mac, R. I.C. (1990). Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. **J. Appl. Bacteriol.** 69: 332-337.
- Makino, K.; Yokoyama, K.; Kubota, Y.; Yutsudo, C. H.; Kimura, S.; Kurokawa, K.; Ishii, K.; Hatorri, M.; Tatsuno, I.; Abe, H.; Iida, T.; Yamamoto, K.; Onishi, M.; Hayashi, T.; Yasenaga, T.; Honda, T.; Sasakawa, C.; Shinagawa, H. (1999). Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. **Genes Genet. Syst.** 74: 227-239.
- Martin-Carnahan, A.; Joseph, S.W. (2005). Order XII. Aeromonadales ord. nov. In: Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Garrity, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), p. 556.
- Martínez-Murcia, A.J. (1999). Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization Group 11 and *Aeromonas* Group 501. **Int Syst Bacteriol.** 49 : 1403-1408.
- Martínez-Murcia, A.J. ; Figueiras, M.J. ; Saavedra, M.J. ; Stackebrandt, E. (2007). The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6<sup>T</sup>, is not a member of the genus *Aeromonas*. **Int. Microbiol.** 10 : 61-64.
- 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.
- Martins, L.M.; Marquez, R.F.; Yano, T. (2002). Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food in human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** 32: 237-242.
- McMahon, M.A.S.; Wilson, I.G. (2001). The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **Int. J. Food Microbiol.** 70: 155-162.
- Medrano, M.S.; Ding, Y.; Wang, Y.D.; Lu, P.; Coburn, J.; Hu, L.T. (2007). Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. **J. Bacteriol.** 189: 2653-2659.
- Miñana-Galbis, D.; Farfán, M.; Fuste, M.C.; Loren, J.G. (2004). *Aeromonas molluscorum* sp.

- nov., isolated from bivalve molluscs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 2073-2078.
- Monnet V (2003). Bacterial oligopeptide-binding proteins. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** 60, 2100-2014.
- Payne JW, Gilvarg C (1968). Size restriction on peptide utilization in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry.** 243: 6291-6299.
- Moutran, A.; Balan, A; Ferreira, L.C.S.; Giorgetti, A.; Tramontano, A.; Ferreira, R.C.C. (2007). Structural model and ligand interactions of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* oligopeptide-binding protein. **Genetics and Molecular Research.** 6: 1169-1177.
- Nawaz, M.; Sung, K.; Khan, S.A.; Khan, A.A.; Steele, R. (2006). Biochemical and Molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from Catfish. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 6461-6466.
- Nepomuceno, R.S.L.; Tavares, M.B.; Lemos, J.A.; Griswold, A.R.; Ribeiro, J.L.; Balan, A.; Guimarães, K.S.; Cai, S.; Burne, R.A.; Ferreira, L.C.S.; Ferreira, R.C.C. (2007). The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence, and characterization. **Oral Microbiology Immunology.** 22: 1-8.
- Neru HC, Hepell LA (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 Protection.** 53: 78-80.
- Nicolás, M.F.; Barcellos, F.G.; Hess, P.N.; Hungria, M. (2007). ABC transporters in *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*: insights into evolution and pathogenicity. **Genetics and Molecular Biology.** 30: 202-211.
- Nojimoto, I.T.I.; Bezana, C.S.C.; Carmo C.; Valadão, L.M.; Carrijo, K.M. (1997). Prevalência de *Aeromonas* spp em Fezes Diarréicas de Crianças Menores de 5 Anos de Idade na Cidade de Goiana, Goiás, no Biênio 1995-1996. **Rev. Soc. Bras. de Med. Tropical.** 30:

385-388.

Oswald, C.; Holland, I.B.; Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters.

**Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 372: 385-399.

Palumbo, S.A. (1996) The *Aeromonas hydrophila* group in food. In: Austin, B.; Altwegg, M.;

Gosling, P.J.; Joseph, S.W. **The Genus *Aeromonas***. New York: John Wiley & Sons. p.

287-304.

Palumbo, S.A.; Bencivango, M.M.; Del Corral, F. (1989). Characterisation of the *Aeromonas*

*hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. **J. Clin. Microbiol.** 27:854-

859.

Parkhill, J.; Dougan, G.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Pickard, D.; Wain, J.; Churcher, C.;

Mungall, K. L.; Bentley, S. D.; Holden, M. T. G.; Sebaihia, M.; Baker, S.; Basham, D.;

Brooks, K.; Chillingworth, T.; Connerton, P.; Cronin, A.; Davis, P.; Davies, R. M.; Dowd,

L.; White, N.; Farrar, J.; Feltwell, T.; Hamlin, N.; Haque, A.; Hien, T. T.; Holroyd, S.;

Jagels, K.; Krogh, A.; Larsen, T. S.; Leather, S.; Moule, S.; Ó'Gaora, P.; Parry, C.; Quail,

M.; Rutherford, K.; Simmonds, M.; Skelton, J.; Stevens, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G.

(2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enteric*

serovar Typhi CT18. **Nature.** 413: 848-852.

Paulsen, I.T.; Nguyen, L.; Sliwinski, M.K.; Rabus, R.; Saier Jr, M.H. (2000). Microbial

genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *Journal of*

*Molecular Biology.* 301: 75-100.

Payne JW.; Gilvarg C (1968). Size restriction on peptide utilization in *Escherichia coli*. **The**

**Journal of Biological Chemistry.** 243: 6291-6299.

Pidiyar, V.; Kasnowski, A.; Narayan, N.B.; Shouche, Y.S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp.

nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. **Int J Syst Evolut Microbiol.** 32:

1723-1728.

- Pillai, L.; Sha, J.; Erova, T.E.; Fadl, A.A.; Khajanchi, B.K.; Chopra, A.K. (2006). Molecular and functional characterization of a ToxR-regulated lipoprotein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 74: 3742-3754.
- Ponte-Sucre, A. (2007). Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporters blockers. **Applied Microbiology Biotechnology.** 76: 279-286.
- Popoff, M.; Lallier, R. (1984). Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. **Meth. Microbiol.** 16: 127 - 145.
- Rahman, M.; Huys, G.; Rahman, M.; Albert, M.J.; Kühn, I.; Möllby, R. (2007). Persistence, transmission, and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. **Appl. Environ. Microbiol.** 73: 1444-1451.
- Reith, M.E.; Singh, R.K.; Curtis, B.; Boyd, J.; Bouevitch, A.; Kimball, J.; Munholland, J.; Murphy, C.; Sarty, D.; Williams, J.; Nash, J.; Johnson, S.; Brown, L. **The genome sequence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449** (Unpublished) seqüência depositada NC\_009348.
- Ren, Q.; Paulsen, I.T. (2005). Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. **Plos Computacional Biology.** 1: 0190-0201.
- Rocha, S.M. (2004). Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins-SP. **Dissertação de Doutorado.** Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rossi Júnior, O.D.; Amaral, L.A.; Nader Filho, A. (2000). Bactérias do Gênero *Aeromonas* em Água de Matadouro Bovino. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.** 52(5).

- Rudner, D.Z.; Ledeaux, J.R.; Ireton, K.; Grossman, A.D. (1991). The SPOOK locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. **J. Bacteriol.** 173: 1388-1398.
- 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.
- Samen, U.; Gottschalk, B.; Eikmanns, B.J.; Reinscheid, D.J. (2004). Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. **J. Bacteriol.** 186: 1398-1408.
- Schmitt, L.; Tampé, R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. **Current Opinion in Structural Biology.** 12: 754 – 760.
- 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.
- Snellman, E.A.; Sullivan, E.R.; Colwell, R.R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter*. sp. RAG-1. **Eur. J. Biochem.** 269: 5771-5779.
- Solomon, J.; Su, L.; Shyn, S.; Grossman, A.D. (2003). Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport. **J. Bacteriol.** 185: 6425-6433.
- Staats, C.C.; Boldo, J.; Broetto, L.; Vainstein, M.; Schrank, A. (2007). Comparative genome analysis of proteases, oligopeptide uptake and secretion systems in *Mycoplasma* spp. **Genetics and Molecular Biology.** 30: 225-229.

- Subashkumar, R.; Thayumanavan, T.; Vivekanandhan, G.; Kakshmanaperumalsamy, P. (2006). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in Acute Gastroenteritis Among Children. **Indian. J. Med. Res.**123: 61-66.
- Swift, S.; Lynch, M. J., Fish, L.; Kirke, D. F.; Tomas, J. M.; Stewart, G. S. ; Williams, P. (1999). Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 67: 5192-5199.
- Szczuka, E.; Kaznowski, A. (2004). Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. Strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. **J. Clin. Microbiol.** 42: 220-228.
- Tame, J.R.H., Murshudow, G.N., Dodson, E.J., Neil, T.K., Dodson, G.G., Higgins, C.F. Wilkinson, A.J. (1994) The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science* 264: 1578-1581.
- Tanabe, M.; Atkins, H.S.; Harland, D.N.; Elvin, S.J.; Stagg, A.J.; Mirza, O.; Titball, R.W.; Byrne, B.; Brown, K.A. (2006). The ABC Transporter Protein OppA Provides Protection against Experimental *Yersinia pestis* Infection. **Infection and Immunity**, 74: 3687-3691.
- Tequianes-Bravo, L.; Pérez-González, D.A.; González-Malváez, M.M.; Flores-Pimentel, M.; Marroquín-Segura, R. (2004). Aislamiento de *Aeromonas* Productoras de Aerolisina y Enterotoxina, em Amuestras de Água Potable em la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y Otras Dependências de la Universidad Nacional Autónoma de México. **Revista de la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica.**30: 23-29.
- Wang, C.; Lin, C.; Luo, Y.; Tsai, P.; Lin, Y.; Lin, M.T.; Chuang, W.; Liu, C.; Wu, J. (2005). Effects of oligopeptide permease in Group A Streptococcal infection. **Infect. Immun.** 73: 2881-2890.



- Wang, X.; Kidder, J.M.; Scagliotti, J.P.; Klempner, M.S.; Noring, R.; Hu, L. T. (2004). Analysis of differences in the functional properties of the substrate binding proteins of the *Borrelia burgdorferi* oligopeptide permease (*opp*) operon. **J. Bacteriol.** 186:51-60.
- 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.
- Wretling, B.; Möllby, R.; Wadström, T. (1971). Separation of two Hemolysins from *Aeromonas hydrophila* by Isoelectric Focusing. **Infect. Immun.** 4: 503-505.
- Yáñez, M.A.; Catalán, V.; Apráiz, D.; Figueiras, M.J.; Martínez-Murcia, A.J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyB* gene sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.** 53: 875-883.
- Yang, F.; Yang, J.; Zhang, X.; Chen, L.; Jiang, Y.; Yan, Y.; Tang, X.; Wang, J.; Xiong, Z.; Dong, J.; Xue, Y.; Zhu, Y.; Xu, X.; Sun, L.; Chen, S.; Nie, H.; Peng, J.; Xu, J.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Wen, Y.; Yao, Z.; Shen, Y.; Qiang, B.; Hou, Y.; Yu, J.; Jin, Q. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. **Nucleic Acids Research.** 33: 6445-6458.
- Young J.; Holland I.B. (1999). ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. **Biochim. Biophys. Acta.** 1461: 177-200
- 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: 4469-44777.

- Zaitseva, J.; Oswald, C.; Jumpertz, T.; Jenewein, S.; Wiedenmann, A.; Holland, B.; Schmitt, L. (2006). A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of na ABC-ATPase domain dimer. The **Embo Journal**. 25: 3432-3443.
- Zanella, J.F.P. (2002). Avaliação da incidência de *Aeromonas* em trabalhadores de aviários e estudo da resposta ao contato permanente com *Aeromonas*. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Zhang, Y.L.; Ong, C.T.; Leung, K.Y. (2000). Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. **Microbiology**. 146: 999-1009.
- 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 Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interations. Weinheim: Willey-VCH. p. 276-280.