

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

ESTUDO DE PROTEASES EXTRACELULARES DE
Aeromonas spp

JUCIMAR ZACARIA

CAXIAS DO SUL
2009

JUCIMAR ZACARIA

ESTUDO DE PROTEASES EXTRACELULARES DE
Aeromonas spp

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Dr. Sergio O. Pinto da Costa

Caxias do Sul
2009

Dedico este trabalho a todos aqueles que me incentivaram a sempre buscar algo mais, a não acreditar em receitas prontas, a experimentar, em especial ao meu pai, a minha mãe e a minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Sergio Echeverrigaray que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, que acreditou e confiou em mim, que me ensinou muito e que faz da pesquisa mais do que uma profissão, uma vocação. Meu muito obrigado!

Ao professor Sergio Olavo Pinto da Costa pelo seu exemplo como pesquisador e como pessoa.

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

A professora Mirian Salvador pelo acompanhamento crítico ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia, pela colaboração, incentivo, ótima convivência e amizade.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia pelos exemplos e conhecimentos transmitidos.

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

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

Muito obrigado!

INDICE

Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1. Características bioquímicas, distribuição e fatores de patogenicidade do gênero <i>Aeromonas</i>	04
3.1.1. Ocorrência e distribuição de bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	07
3.1.2. Fatores de patogenicidade associados a bactérias do gênero <i>Aeromonas</i>	10
3.2. Proteases microbianas	11
3.2.1. Classificação das proteases microbianas	11
3.2.2. Proteases extracelulares em <i>Aeromonas</i>	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Linhagens bacterianas e condições de cultivo	20
4.2. Obtenção de extratos proteolíticos de <i>Aeromonas</i>	21
4.3. Avaliação quantitativa da atividade caseinolítica em <i>Aeromonas</i>	22
4.4. Avaliação semi-quantitativa da atividade caseinolítica e gelatinolítica em <i>Aeromonas</i>	22
4.5. Avaliação do efeito de fontes de carbono e nitrogênio sobre a atividade	

caseinolítica extracelular em <i>A. hydrophila</i> IBAer109	23
4.6. Avaliação do efeito reversor de diferentes cátions sobre a atividade de metaloproteases de <i>A. hydrophila</i> IBAer 109	24
4.7. Zimogramas de proteases extracelulares de <i>Aeromonas</i>	24
4.8. Determinação de serino e metaloproteases extracelulares em <i>Aeromonas</i>	25
4.9. Avaliação de proteases extracelulares de <i>Aeromonas</i> em zimogramas empregando distintos substratos	26
4.10. Amplificação e clonagem do gene da elastase de <i>A. hydrophila</i>	27
4.10.1. Amplificação do gene da elastase	27
4.10.2. Separação e visualização do segmento amplificado	28
4.10.3. Ligação e clonagem do gene da elastase	29
4.10.4. Obtenção de células competentes e transformação	29
4.11. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Atividade caseinolítica e gelatinolítica semi-quantitativa em <i>Aeromonas</i>	32
5.2. Variabilidade nos perfis de proteases extracelulares de <i>Aeromonas</i>	43
5.3. Caracterização de proteases extracelulares em <i>Aeromonas</i>	51
5.3.1. Determinação de serino e metaloproteases extracelulares em <i>Aeromonas</i>	51
5.3.2. Especificidade por substratos em proteases extracelulares de <i>Aeromonas</i>	54
5.4. Clonagem do gene <i>ahyB</i> de <i>A. hydrophila</i> e expressão heteróloga da elastase	57
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação das principais proteases microbianas, seu modo de ação e seu respectivo número no Cômite de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.	13
Tabela 2. Descrição das linhagens de <i>Aeromonas</i> spp.: denominação, espécie e origem.	21
Tabela 3. Descrição das bactérias empregadas para análise de serino e metaloproteases em zimogramas com respectivo código, espécie e origem.	26
Tabela 4. Atividade proteolítica em placas de LB com caseína 1% após 24h.	33
Tabela 5. Atividade proteolítica em placas de LB com caseína 1% após 48h.	34
Tabela 6. Atividade gelatinolítica em placas de LB com gelatina 0,75% após 24h.	35
Tabela 7. Atividade caseinolítica de extratos brutos de 47 isolados de <i>Aeromonas</i> .	37
Tabela 8. Atividade caseinolítica e elastolítica dos parentais e transformante.	60
Tabela 9. Atividade caseinolítica extracelular e periplasmática dos parentais e transformante.	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atividade proteolítica semi-quantitativa em meio LB acrescido de 1% de leite em pó desnatado (molico). 32
- Figura 2.** Efeito de gelatina (A), glicose (B), citrato (C), glicose e gelatina (D), e amônio (E) sobre a produção de proteases extracelulares de *A. hydrophila* IBAer 109. 39
- Figura 3.** Crescimento (□) e produção de proteases extracelulares (●) por *A. hydrophila* IBAer 109 (A) e produção de proteases em função da densidade celular (B). 41
- Figura 4.** Reversão do efeito inibitório do EDTA sobre a atividade de metaloproteases extracelulares pela adição de distintos cátions (10mM). 42
- Figura 5.** Representação do perfil de proteases extracelulares utilizando gelatina como substrato. 44
- Figura 6.** Análise de agrupamento (UPGMA) de distintas *Aeromonas* baseado no perfil de atividade gelatinolítica, esquema das bandas e seus pesos moleculares estimados. 46
- Figura 7.** Representação do perfil de proteases extracelulares utilizando caseína como substrato. 47
- Figura 8.** Análise de agrupamento (UPGMA) de distintas *Aeromonas* baseado no perfil de atividade caseinolítica, esquema das bandas e seus pesos moleculares estimados. 49
- Figura 9.** Relação entre a atividade caseinolítica avaliada pela hidrólise de azocaseína e pelo somatório das áreas padronizadas das bandas detectadas em

géis contendo caseína.	50
Figura 10. Atividade proteolítica em géis de poliacrilamida co-polimerizados com gelatina. A- Gel sem tratamento; B- Gel tratado com 10mM EDTA; C- Gel tratado com 1mM PMSF.	52
Figura 11. Esquema do perfil de proteases extracelulares de <i>Aeromonas</i> sobre distintos substratos.	55
Figura 12. Atividade caseinolítica da linhagem <i>E. coli</i> DH5 α (1), transformante Elast7 (2) e <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 (3), após 60h de crescimento a 37°C em meio LB+1% de leite desnatado (molico).	58
Figura 13. Análise de restrição (A) e mapa (B) do plasmídio quimérico pJET-Elastase.	59
Figura 14. Curva de atividades caseinolíticas extracelulares (A) e crescimentos (B) das linhagens <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 ($\square$), <i>E. coli</i> DH5 α ($\triangle$) e o transformante Elast7 ($\blacksquare$) em meio LB com 1% de gelatina.	61
Figura 15. Perfil de proteases extracelulares (atividade gelatinolítica) do transformante: Elast7- periplasma (1), Elast7- extracelular (2), ATCC7966 – extracelular (3), DH5 α - extracelular (4).	62
Figura 16. Indução da atividade proteolítica por IPTG no transformante Elast7. <i>E. coli</i> (1), transformante Elast7 (2) e <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 (3). Sem IPTG (A) e com IPTG (B).	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC- *American Type Culture Collection.*

AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism.*

CCT- *Coleção de Culturas Tropicais – Andre Tosello (Brasil).*

CECT- *Collécion Española de Cultivos Tipo.*

C4-HSL- *N-butanoil-L-homoserino-lactona*

DFP- *Di-iso Propyleluorophosphate.*

DL₅₀- *Dose letal capaz de matar 50% da população.*

DNA- *Deoxiribonucleic Acid.*

D.O.- *Densidade Óptica.*

EDTA- *Ethylenediamine tetraacetic acid.*

EGTA- *Ethylene glycol tetraacetic acid.*

EPA- *Environmental Protection Agency.*

ERIC-PCR- *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence.*

fAFLP- *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism.*

IOC-*Instituto Osvaldo Cruz.*

IPTG- *Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside.*

KDa- *Kilodalton.*

NCBI- *National Center for Biotechnology Information.*

NCIB- *National Collection of Industrial Bacteria.*

OMS- *Organização Mundial da Saúde.*

OP- *1,10-orto-fenantrolina.*

PCMB- *p*-Chloromercuribenzoic acid.

PCR- *Polymerase Chain Reaction.*

pb- Pares de Base.

PMSF- *Phenylmethanesulphonylfluoride.*

RAPD- *Random Amplification of Polymorphic DNA.*

RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism.*

SDS- *Sodium Dodecyl Sulfate.*

SDS-PAGE- *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.*

TBE- Tris-Borate-EDTA.

TCA- *Tri Chloro Acetic Acid.*

TLCK- *Tosil-L-lisinaclorometil-cetona*

U- Unidade

UFC- Unidade Formadora de Colônia.

UPGMA- *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic.*

Vero- *Verda Reno.*

3,4-DCI- *3,4-Dichloroisocoumarin.*

RESUMO

Aeromonas são bactérias Gram-negativas aquáticas. Algumas espécies deste gênero são patógenos oportunistas de muitos animais aquáticos e terrestres, inclusive o homem. Vários fatores de virulência, tais como enterotoxinas, hemolisinas e outras enzimas, tem sido associados com a sua patogenicidade. As proteases extracelulares devem ser vistas como importantes enzimas envolvidas na versatilidade metabólica que possibilitam as *Aeromonas* persistir nos ambientes aquáticos, interagir com outros organismos, e causar doenças. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar: as diferenças nas atividades de proteases extracelulares e o perfil eletroforético entre espécies e isolados de *Aeromonas*, a especificidade por substratos de proteases de *Aeromonas*, e a clonagem e expressão heteróloga da elastase de *Aeromonas*. Os resultados mostraram que *A. hydrophila* apresenta maior atividade proteolítica, sem, entretanto exibir diferenças significativas entre isolados clínicos e ambientais. Zimogramas proteolíticos dos isolados de *Aeromonas* demonstraram diferentes perfis com 0 a 5 bandas, correspondendo a metalo, serino ou outras proteases. Duas proteases (56K Da e 22 KDa) apresentaram atividade sobre um grande espectro de substratos. A atividade caseinolítica de *A. hydrophila* IBAer 109 mostra um típico comportamento de “quorum sensing”, sendo induzida por gelatina e reprimida por glicose, citrato e amônio. O gene da elastase (*ahyB*) de *A. hydrophila* ATCC7966 foi clonado e expresso em *E. coli* sob controle do promotor *lac*. O transformante apresentou bandas proteolíticas de 63 e 38 KDa no espaço periplasmático e extracelular, indicando maturação parcial e dificuldade de secreção desta enzima.

Palavras-chave: *Aeromonas*, proteases extracelulares, zimogramas, especificidade das proteases, elastase.

ABSTRACT

Aeromonas are ubiquitous water-borne Gram-negative bacteria. Some species of this genus are opportunistic pathogens of a variety of aquatic and terrestrial animals, including humans. Several virulence determinants, such as enterotoxins, hemolysins and hydrolytic enzymes, have been implicated in their ability to cause diseases. Extracellular proteases may be regarded as important enzymes in the mechanisms that confer the metabolic versatility that allow *Aeromonas* to persist in aquatic habitats, to interact with other organisms, and to cause diseases. In this context, the objective of this work was to assess the extent of differences in extracellular proteases activity and electrophoretic profiles among *Aeromonas* strains, the substrate specificity among *Aeromonas* proteases, and the cloning and heterologous expression of *Aeromonas* elastase. The results showed that *A. hydrophila* has the highest proteolytic activity with no significant difference between clinical and environmental isolates. Protease zymograms of *Aeromonas* isolates showed different profiles with 0 to 5 bands, corresponding to metallo, serine and other proteases. Two proteases (56 KDa and 22 KDa) showed activity against a large spectrum of substrates. Caseinolytic activity of *A. hydrophila* IBAer 109 showed a typical “quorum sensing” behavior, and was induced by gelatin and repressed by glucose, citrate and ammonium. The elastase gene (*ahyB*) of *A. hydrophila* ATCC7966 was cloned and expressed in *E. coli* under the control of *lac* promoter. The transformant showed both periplasmic and extracellular proteolytic bands of 63 and 38KDa, indicating partial maturation and secretion difficulties.

Key-words: *Aeromonas*, extracellular protease, zymograms, protease specificity, elastase.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Aeromonas*, família Aeromonadaceae, são bacilos Gram-negativos, amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados comumente em ecossistemas aquáticos que englobam desde rios, lagos, reservatórios, até locais de tratamento de água potável e de esgoto. Estas bactérias são caracterizadas como oxidase e catalase positivas, redutoras de nitrato a nitrito, fermentadoras de D-glicose, assim como vários outros carboidratos, com formação de ácido e/ou gás.

Aeromonas spp. são patógenos oportunistas tanto de animais de sangue frio quanto de sangue quente. A identificação fenotípica dentro do gênero *Aeromonas*, permite a separação de dois grupos: o grupo “*hydrophila*”, e o grupo “*salmonicida*”. O grupo “*hydrophila*” compreende as espécies móveis destacando-se *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria* e *veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trota*, em virtude de sua potencial capacidade de causar infecções em humanos. Já o grupo “*salmonicida*” compreende espécies não móveis como *A. salmonicida* e *A. sobria*, normalmente associadas a infecções em peixes e humanos, respectivamente.

A virulência em *Aeromonas* é multifatorial, destacando-se: citotoxinas, enterotoxinas, alfa e beta hemolisinas, proteases, lipases e mecanismos de aderência e secreção.

Dentre estes fatores de virulência, as proteases extracelulares desempenham um importante papel inicial na invasão e no estabelecimento desta bactéria em infecções. Estas enzimas atuam no rompimento de ligações peptídicas, ocasionando em alguns casos, alterações em funções fisiológicas do hospedeiro. Além disso, proteases produzidas por estas bactérias estão associadas à maturação de toxinas como anafilatoxina C5 e aerolisinas, outros

importantes fatores de patogenicidade. Por outro lado, as proteases extracelulares desempenham papel fundamental no processo de utilização de proteínas como fontes de carbono e nitrogênio, garantindo a sobrevivência saprofítica destes organismos em distintos ambientes. Embora vários trabalhos tenham sido realizados com o intuito de purificar e caracterizar proteases em *Aeromonas*, cada um deles investiga uma única linhagem, a qual varia de autor para autor, o que em alguns casos, gera controvérsias tornando difícil à comparação dos dados. Estudos empregando um maior número de isolados comparando seus perfis proteolíticos e algumas de suas propriedades moleculares ainda são escassos justificando assim a importância do presente trabalho.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi contribuir para o conhecimento das proteases extracelulares de *Aeromonas* através da: (1) avaliação da diversidade de proteases extracelulares em distintos isolados de *Aeromonas* spp.; (2) caracterização de proteases extracelulares (serino e metaloproteases) e sua especificidade por substrato; e (3) clonagem e expressão heteróloga da elastase de *A. hydrophila*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

3.1 Características bioquímicas, distribuição e fatores de patogenicidade do gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* é constituído por bacilos Gram-negativos, não esporulantes, em forma de “vírgula”, retos com extremidades arredondadas, ou células que se aproximam da forma “esférica”. As bactérias deste gênero são caracterizadas como catalase e oxidase positivas, anaeróbicas facultativas, quimiorganotróficas, redutoras de nitrato a nitrito, inositol negativas, fermentadoras de glicose e vários outros carboidratos, com formação de ácido e/ou gás e resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato) (Garrit *et al.*, 2001; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005). Estas bactérias podem se apresentar

isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, geralmente monotríquias, embora flagelos peritríquios possam ser formados em culturas jovens em meio sólido (Koneman *et al.*, 2001).

Este gênero apresenta espécies consideradas móveis e não móveis. A mobilidade dessas bactérias geralmente ocorre devido à presença de flagelos polares com algumas evidências de flagelos laterais (Garrit *et al.*, 2001). Algumas bactérias deste gênero são produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas e quitinase, as quais, normalmente, estão relacionadas a processos infecciosos (Popoff & Lallier, 1984; Carnahan & Altwegg, 1996; Altwegg, 1999; Koneman *et al.*, 2001; Abbott, 2003; Bernardes *et al.*, 2003; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005).

As *Aeromonas* são consideradas microrganismos psicrófilos e/ou mesófilos e apresentam capacidade de crescimento em uma variada escala de condições ambientais como: valores de pH variando entre 4,0 e 10,0, concentrações salinas de até 6,5% (p/v) e temperatura de crescimento entre 4°C e 42°C, com ótimo entre 28 e 37°C (Delamare *et al.*, 2000; Garrit *et al.*, 2001; Zucolotto *et al.*, 2006).

De um modo geral, o gênero *Aeromonas* tem sido considerado um grupo de taxonomia complexa. Nas últimas duas décadas, o gênero tem sofrido uma série de revisões taxonômicas e em sua nomenclatura. Durante algum tempo o gênero *Aeromonas* foi classificado dentro da família Vibrionaceae (Carnahan & Altwegg, 1996; Altwegg, 1999), mas atualmente encontra-se classificado em uma família própria denominada Aeromonadaceae inicialmente sugerida por Colwell & MacDonell (1986) e Martinez-Murcia *et al.* (1992) através da análise de sequências do 16S rRNA e 5S rRNA e confirmada recentemente no manual Berger's (Garrit *et al.*, 2001).

Semelhanças fenotípicas entre as espécies de *Aeromonas*, associadas à grande diversidade desses organismos, tornam sua identificação ao nível de espécies um processo exaustivo e complicado. Por essa razão, pesquisadores estão associando métodos moleculares às técnicas bioquímicas (Borrel *et al.*, 1997; Janda & Abbott, 1998). Os métodos moleculares empregados estão baseados na amplificação e sequenciamento de genes como 16S rRNA, *gyrB* (subunidade B da DNA girase) e *rpoD* (fator σ^{70}), sendo os dois últimos alternativas mais promissoras para a separação de espécies (Borrel *et al.* 1997; Yáñez *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2006). Além destes, métodos auxiliares como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism* (fAFLP), *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence* (ERIC-PCR), hibridização DNA-DNA, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR), entre outros, tem contribuído para uma melhor identificação e separação de espécies deste gênero (Joseph & Carnahan, 2000; Saha & Chakrabarti, 2006; Miñana-Galbis *et al.*, 2007; Martinez-Murcial *et al.*, 2008).

De acordo com a última edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* o gênero compreende as seguintes espécies: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida* (subespécies *salmonicida*, *achromogenes*, *masoucida*, *pectinolytica* e *smithia*), *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* (biovars *sobria* e *veronii*), *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia*, e *Aeromonas popoffii* (Garrit *et al.*, 2001). Além destas, seis novas espécies e outras duas subespécies foram descritas recentemente: *Aeromonas culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002), *Aeromonas simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004), *Aeromonas molluscorum* (Miñana-Galbis *et*

al., 2004), *Aeromonas sharmiana* (Saha & Chakrabarti, 2006), *Aeromonas bivalvium* (Miñana-Galbís *et al.*, 2007), *Aeromonas aquariorum* (Martínez-Murcia *et al.*, 2008) e as novas subespécies correspondem a *Aeromonas hydrophila* subspécies *dhakensis* e *ranae* (Huys *et al.*, 2002; Huys *et al.*, 2003).

Algumas espécies estão associadas com uma ampla variedade de doenças em animais de sangue quente e frio, incluindo peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Em humanos, *Aeromonas* spp são responsáveis por gastroenterites, diarreia crônica, infecções cutâneas, infecções do trato respiratório, peritonites, infecções do trato urinário e septicemia. Entre as *Aeromonas* apenas cinco espécies (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) são reconhecidas como os patógenos humanos (Janda & Abbott, 1998).

3.1.1 Ocorrência e distribuição de bactérias do gênero *Aeromonas*

Aeromonas spp. são bactérias amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente encontradas em muitos ecossistemas aquáticos em praticamente todas as latitudes (Handfield *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1996; Borrel *et al.*, 1997; Janda & Abbott, 1998; Chacón *et al.*, 2003). Esta ampla distribuição deve-se à sua capacidade de utilização de distintos substratos e tolerância a condições de estresse (Delamare *et al.*, 2000; Garrit *et al.*, 2001; Zucolotto *et al.*, 2006).

Estas bactérias podem ser isoladas em vários ambientes aquáticos, incluindo ambientes estuarinos, águas superficiais (especialmente recreativas), águas potáveis (incluindo águas tratadas, águas de poços e águas engarrafadas), águas poluídas e águas

provenientes de efluentes de esgoto (Van der Kooj, 1988; Montfort & Baleux, 1991; Alonso *et al.*, 1994; Holmes & Nicolls, 1995; Holmes *et al.*, 1996). Embora estes organismos não sejam, em geral, considerados marinhos, podem ser encontrados naturalmente em ambientes de transição que apresentem uma interface de troca com ambientes aquáticos continentais (Hazen *et al.*, 1978). Em rios ou em ambientes marinhos as contagens variam entre 10 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 a 10^3 UFC/mL (Holmes *et al.*, 1996).

Bactérias do gênero *Aeromonas* também são frequentes em peixes, anfíbios, répteis, aves, frutos do mar, fezes de animais podendo ser encontradas, eventualmente, em fezes humanas (Koneman *et al.*, 2001; Bernardes *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2003; Figueras, 2005).

As *Aeromonas* também são encontradas em um grande número de alimentos frescos tanto de origem animal quanto vegetal, e alimentos processados, inclusive naqueles refrigerados (Buchanan & Palumbo, 1985; Saad *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Altwegg, 1999; Albert *et al.*, 2000; Figueras, 2005).

Estudos relacionados à epidemiologia das gastroenterites vinculadas à presença de *Aeromonas* spp. tem estabelecido a água como principal veículo de transmissão direta ou indireta (Neves *et al.*, 1990; Hänninen & Sitonen, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Bulhões & Rossi Júnior, 2002, Figueras, 2005). Neste sentido, 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, respectivamente, e concluíram que o consumo dessas águas pode representar um risco para saúde dos consumidores. A esse respeito, Burke *et al.* (1984) na Austrália, em um sistema de distribuição de água não clorada, encontraram

Aeromonas em 34% das amostras analisadas, coliformes totais em 23% e *Escherichia. coli* em 11%. Das *Aeromonas* isoladas 9,9% eram provenientes do sistema de captação, 51,7% do armazenamento e 33% do sistema de distribuição. Hande *et al* (2006), em um estudo sazonal em 11 reservatórios de água utilizados para consumo humano, na Índia, identificaram a presença de *Aeromonas* em 54,5% dos reservatórios sendo que 36,6% demonstraram consistência em todos os períodos analisados.

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, sugerindo como fonte de contaminação a água de abastecimento (Bizani & Brandelli, 2001).

Já em aves, Costa & Rossi Júnior (2002), avaliaram 200 amostras de diferentes produtos e locais do fluxograma de abate de frangos e isolaram *Aeromonas* spp. em 36% das amostras de penas, em 56% das amostras de fezes, em 72% de carcaças evisceradas, não evisceradas, e resfriadas, e 80% em de água de pré-resfriamento. Neste trabalho, não foram isoladas *Aeromonas* spp. da água de abastecimento da indústria e da água do tanque de escaldagem.

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* biovar. *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).

As análises de mexilhões comercializados no Rio de Janeiro mostraram a presença de *Aeromonas* em 86% das amostras, sendo *A. media* a espécie mais freqüente (Pereira *et al.*,

2004). Na Espanha, Miñana-Galbis (2002) encontraram 45,5% de *A. caviae* em amostras de moluscos bivalves.

As variáveis que determinam a 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 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 4°C 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.

3.1.2 Fatores de patogenicidade associados a bactérias do gênero *Aeromonas*

Os mecanismos de patogenicidade em *Aeromonas* são complexos e provavelmente agem de forma interativa. Algumas linhagens de *Aeromonas* possuem uma ampla gama de fatores de virulência e alta capacidade invasiva, sendo estes fatores mais freqüentes em amostras clínicas do que em amostras ambientais (Chacón *et al.*, 2003; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Subashkumar *et al.*, 2006).

As espécies estudadas deste gênero possuem diversos fatores de patogenicidade que podem explicar o papel destes microrganismos em distintas afecções. Dentre os principais fatores de patogenicidade 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).

Muitos autores relacionam a patogenicidade de *Aeromonas* com a produção de enzimas proteolíticas extracelulares (Cascón *et al.*, 2000a e b; Albert *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Fadanelli, 2005). O estudo deste fator em particular, é de extrema importância, pois é encontrado em linhagens de origem ambiental e em amostras clínicas, porém com frequência distinta dependendo da protease (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005; Subashkumar *et al.*, 2006).

3.2 Proteases microbianas

3.2.1 Classificação das proteases microbianas

Proteases ou proteinases são definidas como enzimas de degradação que catalisam a hidrólise parcial ou completa de proteínas. A hidrólise de proteínas causa alterações irreversíveis que do ponto de vista biológico, podem ser importantes, principalmente em processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (Barret *et al.*, 2001).

As proteases, de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, são enzimas pertencentes à classe 3, hidrolases, e a subclasse 3.4, peptídio-hidrolases ou peptidases, constituindo assim a grande família EC 3.4 (International Union of Biochemistry, 1992). Entretanto, as proteases não são facilmente inseridas nos sistemas gerais de nomenclatura em virtude de sua grande diversidade de atividades e estruturas. De um modo geral, as proteases são classificadas segundo três

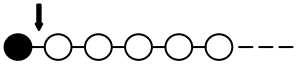
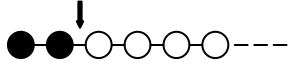
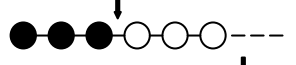
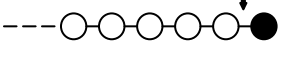
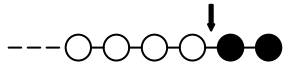
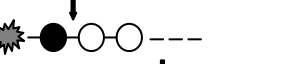
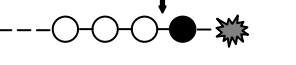
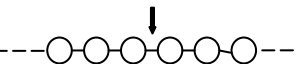
critérios principais: a) tipo de reação catalisada; b) natureza química do sítio catalítico; c) relações evolutivas com referência à estrutura (Barret, 1994).

Com respeito a reação catalisada, podem ser divididas em dois grupos: exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99). Exopeptidases clivam ligações peptídicas próximas ao amino ou carbono terminal do substrato, enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas longe da porção terminal das proteínas (Rao *et al*, 1998).

Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases podem ser classificadas em quatro grupos: serino-proteases, aspártico-proteases, cisteíno-proteases e metaloproteases. Já com base em relações evolutivas, estas enzimas são classificadas em diferentes famílias que posteriormente são subdivididas em clãs a fim de acomodá-las em grupos de peptidases que divergiram de um ancestral comum. Assim, cada família recebeu uma letra como código que demonstrava o tipo de catálise: S (serina), C (cisteína), A (aspartica), M (metalo) ou U (desconhecida) (Rawlings & Barret, 1993; Rao *et al*, 1998). A tabela 1. representa algumas proteases e seu modo de ação.

As serino proteases são enzimas caracterizadas pela presença de um resíduo serina em seu sítio ativo. Baseados em similaridades estruturais são agrupadas em 20 famílias, e subdivididas em seis clãs com ancestrais comuns. As estruturas primárias de membros de quatro clãs: quimotripsina (SA), subtilisina (SB), carboxipeptidase C (SC) e *E. coli* D-Ala-D-Ala peptidase A (SE) não possuem relação entre si, sugerindo que pertencem a quatro origens diferentes de serino-proteases.

Tabela 1. Representação das principais proteases microbianas, seu modo de ação e seu respectivo número no Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

Protease	Modo de ação	EC nº
Exopeptidases		
Aminopeptidases		3.4.11
Dipeptidil peptidase		3.4.14
Tripetidil peptidase		3.4.14
Carboxipeptidase		3.4.16-3.4.18
Serino proteases		3.4.16
Metaloprotease		3.4.17
Cisteíno protease		3.4.18
Peptidil dipeptidase		3.4.15
Dipeptidases		3.4.13
Omega peptidases		3.4.19
		3.4.19
Endopeptidase		
		3.4.21-3.4.34
Serino protease		3.4.21
Cisteino protease		3.4.22
Aspartico protease		3.4.23
Metaloprotease		3.4.24
Endopeptidases de mecanismo catalítico desconhecido		3.4.99

Os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Os círculos sólidos indicam os aminoácidos terminais, e as estrelas significam terminações bloqueadas. As setas representam os sítios de ação da enzima (adaptado de Rao *et al.*, 1998).

Os clãs SA, SB e SC possuem um mecanismo catalítico comum que consiste em uma tríade catalítica de três aminoácidos serina (nucleófilo), aspartato (eletrofílo) e histidina (base). Apesar da orientação espacial desses resíduos ser similar, as dobras protéicas são diferentes, formando um típico exemplo de evolução convergente. Outro aspecto importante é a presença de resíduos conservados de glicina (G) próximo ao resíduo de serina (S) do sítio ativo, formando o motivo G-X-S-X-G (Brenner, 1988; Barret, 1994; Rao *et al.*, 1998).

De modo geral as serino-proteases são reconhecidas por serem inibidas de forma irreversível por 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrano, 2,3-epoxipropileucilamino (4-guanidina) butano, di-isopropilfluorofosfato (DFP), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e tosil-L-lisinaclorometil-cetona (TLCK). Algumas dessas proteases são inibidas por reagentes de tiol como *p*-cloromercuriobenzoato (PCMB) devido à presença de um resíduo de cisteína próximo ao sítio ativo. São geralmente ativas em pH neutro ou alcalino, sendo o pH ideal entre 7 e 11 (Barret, 1994; Rao *et al.*, 1998).

As metaloproteases são enzimas com maior diversidade. Caracterizam-se por necessitarem de íon divalente metálico para sua plena atividade. Incluem enzimas de diversas origens como colágenases de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de ofídios e termolisinas bacterianas (Shannon *et al.*, 1989). Cerca de 30 famílias foram definidas sendo 17 com atividade endopeptidase, 12 com atividade exopeptidase e uma contendo ambas (Barret, 1995). As metaloproteases são agrupadas em clãs baseados na natureza dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação ao metal. Dentre os clãs mais bem estudados estão o MA e MB, os quais apresentam seqüências conservadas H-E-X-X-H-E e H-E-X-X-H-H, respectivamente (Rao *et al.*, 1998). No entanto, existem ainda outros sítios de ligação ao metal que podem apresentar constituição diferencial (Miyoshi & Shinoda, 2000). As

metaloproteases são inibidas por agentes quelantes como ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), ácido etileno glicol tetra acético (EGTA) e 1,10-orto-fenantrolina (OP), mas não por agentes sulfidrilílicos ou di-isopropilfluorofosfato (DFP) (Barret, 1995; Rao *et al.*, 1998). Porém, se posteriormente submetidas a concentrações adequadas de íons divalentes, estas podem recuperar parcial ou totalmente sua atividade.

As aspartico-proteases, também conhecidas como proteases ácidas, dependem da presença de resíduos de ácido aspártico (D) para sua atividade catalítica. O resíduo de ácido aspártico no sítio ativo está geralmente dentro do motivo D-S/T-G. Este grupo de enzimas é inibido por pepstatina e são sensíveis a compostos diazocetônicos, tais como diazoceti-D-L-norleucina metil éster (DAN) e 1,2-epoxi-3-*p*-nitrofenoxi propano (EPNP) na presença de íons de cobre (Barret, 1995; Rao *et al.*, 1998).

Por sua vez, as cisteino proteases são um grupo de enzimas com 20 famílias já conhecidas, cuja atividade depende da presença de uma díade de cisteína (C) e histidina (H) em seu sítio ativo, sendo que a ordem C-H ou H-C difere entre as famílias. Normalmente, estas enzimas são ativas somente na presença de agentes redutores como HCN ou cisteína. As cisteino proteases em sua maioria, apresentam o máximo de atividade em pH neutro, no entanto, algumas apresentam atividade em pH levemente ácido. Estas enzimas são inibidas por agentes sulfidrílicos como *p*-cloromercuribenzoato (PCMB) e iodoacetamida, não sendo afetadas por agentes quelante e por di-isopropilfluorofosfato (DFP) (Barret, 1994; Rao *et al.*, 1998).

As enzimas proteolíticas como um todo, executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância no metabolismo essencial e na regulação fisiológica explicam a sua ocorrência em todos os organismos vivos. De modo geral proteases

intracelulares iniciam um papel crítico na regulação do metabolismo enquanto que proteases extracelulares catalisam a hidrólise de grandes proteínas em pequenas moléculas para subsequente absorção celular. Além de sua relevância em processos fisiológicos, as proteases se apresentam promissoras em processos industriais, sendo responsáveis por 60% do total de enzimas comercializadas em todo o mundo. Entretanto, sua importância também está relacionada a processos patológicos, sendo consideradas como fatores de virulência em muitas bactérias (Goldfrey & West, 1996; Rao *et al*, 1998), entre as quais *Aeromonas* (Shieh, 1982; Sakai, 1985; Nieto & Ellis 1986; Cascón *et al.*, 2000a).

3.2.2 Proteases extracelulares em *Aeromonas*

Proteases extracelulares têm sido identificadas tanto em bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas. Dentre as bactérias estudadas destacam-se *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Serratia spp* entre outras (Häse & Finklestein, 1993; Rao *et al*, 1998).

A virulência em *Aeromonas* é multifatorial. Entretanto, estudos indicam que proteases extracelulares produzidas por este microrganismo, desempenham um importante papel inicial na invasão e no estabelecimento desta bactéria em infecções. Proteases extracelulares produzidas por *Aeromonas salmonicida* foram sugeridas com sendo o mais importante fator de virulência e determinante da patologia conhecida como furunculose em peixes (Ellis *et al.*, 1981; Shieh, 1982; Sakai, 1985).

Dois distintos tipos de proteases, uma metaloprotease termo-estável e uma serino-protease termo-sensível, foram identificadas em vários isolados de *Aeromonas hydrophila* assim como de outras espécies do gênero (Leung & Stenvenson, 1988; Nieto & Ellis 1986).

Esteve e Birbeck (2004), estudando uma linhagem virulenta de *A. hydrophila* EO63 através de focalização isoeletrica e SDS-PAGE, identificaram uma serino protease de 68KDa ativa contra caseína e distintas bandas (60, 44 e 31KDa) representando uma metaloprotease termo-estável com atividade sobre caseína e elastina. Estes autores ainda verificaram que a atividade de serino protease foi quatro vezes maior quando comparada com a atividade da metaloprotease sobre caseína.

Em *A. hydrophila* B51, Nieto & Ellis (1986) utilizando caseína como substrato em zimogramas, identificaram três zonas distintas de atividade proteolítica, com pontos isoeletricos de 6.5-6.8 representadas por duas bandas completamente inibidas por EDTA, com ponto isoeletrico 7.0, representada por uma única banda também inibida por EDTA, e uma zona difusa com ponto isoeletrico 8.3-8.5 parcialmente inibida pelo agente quelante.

Além destas, uma zinco-metaloprotease de 19 KDa foi encontrada em meio de cultivo de uma cepa de *A. hydrophila* isolada do intestino de *Hirudo medicinalis* (Loewy *et al*, 1993) e uma serino protease de 22 KDa termo-estável da linhagem B32 de *A. hydrophila* (Rodriguez *et al*, 1992).

Uma protease de 19 KDa, isolada de *Aeromonas caviae* linhagem Ae6, foi purificada e caracterizada. Esta protease foi identificada como uma Zn/Fe-metaloprotease termo estável. Entre outras características esta enzima não apresentou capacidade de ativação de pro-aerolisina em *Aeromonas*, mas em elevadas concentrações demonstrou atividade citotóxica sobre células Vero (Nakasone *et al.*, 2004). Outra metaloprotease (AsaP1) de 19 KDa, com

elevada virulência em peixes, foi identificada em *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. Esta protease foi caracterizada como pertencente à família das Asp-zincinas endopeptidases zinco-dependente (M35), sendo esta a primeira enzima desta família a ser relacionada como fator de virulência em bactérias (Arnadottir *et al.*, 2009).

O recente seqüenciamento completo do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966, (Seshadri *et al.*, 2006), permitiu a identificação de uma protease extracelular (EprA), previamente descrita por Chang *et al.* (1997) e Yu *et al.* (2005), e de uma metaloprotease similar a uma protease de *Vibrio cholerae*, a qual, pode estar envolvida na degradação de proteínas antimicrobianas produzida pelo hospedeiro.

Dentre as proteases já caracterizadas, a elastase tem sido sugerida como um fator essencial de patogenicidade em *A. hydrophila* AG2. Esta protease em específico, apresenta uma massa molecular de 62,7 KDa, porém a enzima madura quando analisada por SDS-PAGE apresenta uma massa molecular de apenas 38 KDa. A elastase apresenta atividade proteolítica tanto sobre caseína quanto sobre elastina (Cascón *et al.*, 2000a). A análise comparativa da seqüência desta proteína permitiu evidenciar uma elevada similaridade com metaloproteases produzidas por outros microrganismos, especialmente com a elastase de *Pseudomonas aeruginosa* (52% -identidade), zinco-metaloprotease de *Helicobacter pylori* (61% -identidade), e proteases de algumas espécies de *Vibrio* (52 a 53% -identidade). (Cascón *et al.*, 2000a). O estudo envolvendo mutantes insercionais no gene da elastase (*ahpB*) de *A. hydrophila* AG2 e a linhagem selvagem permitiram evidenciar de forma clara que *ahpB* é um fator de virulência. A DL₅₀ para a linhagem selvagem AG2 foi de 6×10^5 UFC enquanto que a DL₅₀ para mutantes *ahpB* foi de 3×10^7 UFC. Além disso, os peixes injetados com a *A. hydrophila* AG2 morreram mais rapidamente que aqueles injetados com os

mutantes para *ahpB*, evidenciando assim o crucial papel desta enzima na patogenicidade da bactéria contra peixes (Cascón *et al.*, 2000a).

A atividade proteolítica em *A. hydrophila* é influenciada tanto por fatores físicos quanto por fatores químicos. Dentre tais fatores os mais relevantes são temperatura, pH e aeração. Entretanto, segundo O'Reilly e Day (1983) a produção de proteases extracelulares pode ser modulada por repressão catabólica mediada por glicose e amônio.

Outro fator que influencia a produção de proteases extracelulares em *Aeromonas* é a densidade celular, fenômeno conhecido como “quorum sensing” e mediado pela síntese e acúmulo de N-butanil-L-homoserina lactona (C4-HSL). Neste sentido, Swift *et al.* (1999) verificou que mutantes no gene *ahyI* (gene responsável pela síntese de C4-HSL, apresentaram redução significativa nas atividades de serina e metaloproteases extracelulares, sendo a mesma restaurada pela adição exógena da homoserina lactona.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens de *Aeromonas* spp. apresentadas na Tabela 2. Estas linhagens foram 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 foram mantidas em meio de Luria Bertani (LB) semi-sólido (10g.L⁻¹ de triptona; 5g.L⁻¹ de extrato de levedura; 5g.L⁻¹ de NaCl; 10g.L⁻¹ de ágar; pH 7.2), a temperatura ambiente. Foram 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 LB sólido. A cada 15 dias, as amostras foram repicadas.

Além do meio LB, o meio mínimo M9 (1 g.L⁻¹ NH₄Cl; 5,9 g.L⁻¹ Na₂HPO₄ 2H₂O; 3 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 5 g.L⁻¹ NaCl; 4,9x10⁻³ g.L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 2x10⁻² g.L⁻¹ glicose; 1,47x10⁻⁴ g.L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O) modificado, pela substituição da glicose por glicerol, a uma concentração final de 0,42% também foi utilizado no crescimento bacteriano para realização de alguns experimentos.

Tabela 2. Descrição das linhagens de *Aeromonas* spp.: denominação, espécie e origem.

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

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

4.2 Obtenção de extratos proteolíticos de *Aeromonas*

As bactérias foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) ou meio M9 modificado, a 37°C sob agitação constante de 180 rpm por 24 h. Esta cultura inicial foi utilizada como pré-inóculo para uma cultura de 5 mL de meio LB ou M9 modificado. A nova cultura foi incubada por 20h a 37°C, sob agitação continua de 180 rpm. Após este período as bactérias foram removidas por centrifugação a 13000 rpm por 3 minutos e os sobrenadantes (extratos

brutos) foram aliquotados em volumes de 1 ml e mantidos a -20°C até o momento das análises. A obtenção de proteínas periplasmáticas foi realizada segundo a metodologia descrita por Neru & Hepel (1965) empregando cloroformio como solvente e a precipitação das enzimas realizada empregando quatro volumes de acetona.

4.3 Avaliação quantitativa da atividade caseinolítica e elastolítica em *Aeromonas*

A atividade proteolítica quantitativa dos extratos brutos bacterianos foi avaliada utilizando azocaseína como substrato de acordo com Bonato *et al* (1982). Brevemente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Alíquotas de 120 µL do sobrenadante foram retiradas e adicionada 380 µL de solução (azocaseína 1%, Tris-HCl 25mM pH 8,0 e 5mM MgCl₂) e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após este período adicionaram-se 600 µl de TCA 10% (ácido tricloroacético), sendo as amostras incubadas a 0°C por 15 minutos, para paralisar a reação. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos, retirando-se 800 µl do sobrenadante e adicionando-se 200 µl de NaOH 1,8 M. A absorbância (420nm) foi determinada em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia). Uma unidade corresponde a um incremento de 0,1 U de D.O.₄₂₀ por mL em 60 minutos a 37°C (Belas *et al.*, 1995).

A atividade elastolítica foi determinada utilizando elastina Congo-Red de acordo com o método descrito por Esteve & Birkbeck (2004).

4.4 Avaliação semi-quantitativa da atividade caseinolítica e gelatinolítica em *Aeromonas*

As bactérias foram crescidas em meio LB, a 37°C, até atingirem a fase estacionária de crescimento. As amostras bacterianas foram inoculadas mediante método de gotas (2 µL) em

placas de Petri contendo meio LB acrescido de 1% de leite em pó desnatado ou 0,75% de gelatina e incubadas por 24h ou 48h a 37°C. No caso de caseína a atividade proteolítica foi evidenciada pela formação de halo translúcido ao redor do crescimento microbiano (Wassif *et al.*, 1995) Já a atividade gelatinolítica foi observada como halos translúcidos após a precipitação da gelatina, através da adição e incubação por aproximadamente 15 minutos, de sulfato de amônio saturado, método este, modificado de Bonato *et al* (1982).

A atividade proteolítica foi avaliada e mensurada mediante a observação direta do halo de degradação gerado pela bactéria. As colônias envolvidas por um halo transparente, que evidenciaram atividade enzimática sobre o meio, foram estimadas segundo a fórmula $[\text{diâmetro do halo} - \text{diâmetro da colônia} / \text{diâmetro da colônia}]$, sendo classificadas como: sem atividade proteolítica (0); baixa atividade proteolítica (0,1 a 0,5); atividade proteolítica media (0,5 a 1,0) e elevada atividade proteolítica ($> 1,0$). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 Avaliação do efeito de fontes de carbono e nitrogênio sobre a atividade caseinolítica extracelular em *Aeromonas hydrophila* IBAer 109

Para esta avaliação foi utilizado o extrato bruto do isolado IBAer 109. O meio mínimo M9 modificado pela adição de 0,42% de glicerol (Riddle *et al.*, 1981) foi empregado na análise. As amostras foram inoculadas por 24 horas em meio M9 modificado e posteriormente reinoculadas no mesmo meio contendo: gelatina 0,1%; gelatina 0,5%; glicose 0,1%; glicose 0,5%; sulfato de amônia 0,1%; sulfato de amônia 0,1% + gelatina 0,1%; citrato de sódio 0,5%; citrato de sódio 0,5% + gelatina 0,1%; glicose 0,1% + gelatina 0,5%; e

glicose 0,5% + gelatina 0,1%. Após 20 horas de crescimento a 37°C sob agitação constante de 180 rpm, alíquotas de 1mL foram retiradas e utilizadas para avaliação da atividade conforme o item 4.3. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6 Avaliação do efeito reversor de diferentes cátions sobre a atividade de metaloproteases de *A. hydrophila* IBAer 109

Ensaio para avaliar a capacidade de reversibilidade da atividade proteolítica de metaloproteases foram realizados com o extrato bruto de *A. hydrophila* IBAer 109 tratado previamente com EDTA 10 mM por um período de 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados os sais: FeCl₂, MnCl₂, CaCl₂ e MgCl₂, em uma concentração final de 10 mM. A avaliação da atividade proteolítica foi realizada conforme o item 4.3. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.7 Zimogramas de proteases extracelulares de *Aeromonas*

Para a análise do perfil diferencial de proteases extracelulares em *Aeromonas*, 17 linhagens e 30 isolados foram utilizados (Tabela 2).

O perfil de proteases extracelulares presentes no sobrenadante foi avaliado através de eletroforese em géis de poliacrilamida 10% co-polimerizados com gelatina ou caseína em concentração final de 0,1% de acordo com o método descrito por Oldak e Trafny (2005).

A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes empregando o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970). A 10 µL de extrato bruto foram acrescidos 15µL

de água e 25 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,4 mM, pH 6,8; SDS 2,5%, glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%), sendo depositados 25 µL no gel. Todas as eletroforeses foram realizadas em sistema vertical Mini-Protean (Bio-Rad), a 4°C com voltagem constante de 80V até o azul de bromofenol atingir o gel de separação e 120V até o final do gel. Após a eletroforese os géis foram submetidos a duas lavagens de 1h cada com Triton-X-100 2,5%, para a retirada do SDS residual. Em seguida, os géis foram incubados a 37°C por 4h em solução tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM de CaCl₂. Para a coloração foi empregado *Coomassie Brilliant Blue* 0,1% dissolvido em etanol : ácido acético : água (30:7:63). As proteases foram visualizadas como bandas de contraste negativo no gel. Todos os géis foram realizados em triplicata.

As áreas das bandas individuais foram determinadas, após digitalização dos zimogramas, através do programa CPATLAS 2.0.

4.8 Determinação de serino e metaloproteases extracelulares em *Aeromonas*

Para fim de determinação de serino e metaloproteases, foram escolhidas 10 linhagens (Tabela 3) representantes dos distintos grupos evidenciados nos zimogramas obtidos com gelatina como substrato (item 4.6).

Na avaliação da atividade proteolítica de serino e metaloproteases foram empregados géis de poliacrilamida 10% co-polimerizados com gelatina 0,1% de acordo com a metodologia descrita no item 4.7.

Tabela 3. Descrição das bactérias empregadas para análise de serino e metaloproteases em zimogramas com respectivo código, espécie e origem.

Código	Espécie	Origem
IBAer004	<i>Aeromonas media</i>	ATCC 33907*
IBAer007	<i>Aeromonas hydrophila</i>	NCIB 9233*
IBAer008	<i>Aeromonas caviae</i>	ATCC 15468*
IBAer010	<i>Aeromonas sobria</i>	IOC
IBAer011	<i>Aeromonas trota</i>	ATCC 49657*
IBAer012	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966*
IBAer015	<i>Aeromonas veronii</i> var. <i>Sobria</i>	ATCC 35624*
IBAer109	<i>Aeromona. hydrophila</i>	Diarréia Humana
IBAer151	<i>Aeromona. hydrophila</i>	Pele Suína
IBAer153	<i>Aeromona. caviae</i>	Pele Suína

ATCC: American Type Culture Collection; NCIB: National Collection of Industrial Bacteria; IOC: Instituto Oswaldo Cruz, sem código de origem; * Cedida por Dr. Naharro - Universidad de León, Espanha

Para diferenciar serino de metaloproteases, as amostras foram tratadas previamente por 10 minutos com 10 mM de EDTA ou com 1 mM de PMSF. Após a retirada do SDS residual, para a verificar a inibição de metaloproteases, os géis foram incubados por 4h em solução tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 ; 5 mM de CaCl₂; 10 mM de EDTA, a 37°C. Já para verificar a inibição de serino proteases, os géis foram incubados por 4 h em solução tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 ; 5 mM de CaCl₂; 1 mM de PMSF, a 37°C. Os géis foram reproduzidos em triplicata e comparados com géis sem a presença de inibidores enzimáticos.

4.9 Avaliação de proteases extracelulares de *Aeromonas* em zimogramas empregando distintos substratos

Para avaliar a atividade proteolítica extracelular frente a distintos substratos, 10 bactérias foram selecionadas (Tabela 3). O perfil de proteases presentes no sobrenadante foi

avaliado através de eletroforese em géis de poliacrilamida 10% co-polimerizados com os seguintes substratos: gelatina, caseína, ovoalbumina fração V, γ -globulina, fibrinogênio, elastina, colágeno e albumina bovina fração V a uma concentração final de 0,1%, de acordo com a metodologia descrita no item 4.7. Para os géis co-polimerizados com ovoalbumina fração V e γ -globulina o tempo de incubação foi estendido para 12h.

4.10 Amplificação e clonagem do gene da elastase de *Aeromonas hydrophila*

4.10.1 Amplificação do gene da elastase

Com o intuito de clonar o gene correspondente a elastase de *Aeromonas* e suas seqüências flanqueadoras, *primers* foram desenhados a partir da seqüência de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 depositada no NCBI, com auxílio dos programas BioEdit 7.0 e FastPCR. Os primers desenhados correspondem a seguintes seqüências:

Forward – 5' GTAAGCTTGTACGCCAAGGGTTTTCCA 3'

Reverse – 5' ACGAATTCTATTACGGTGACTCAGAC 3'

A amplificação do segmento correspondente ao gene da elastase, foi realizada de acordo com o procedimento descrito a seguir:

A linhagem *A. hydrophila* ATCC7966 foi crescida a 37°C/18 h em 5 mL de meio Luria 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 1/40 em água Milli-Q autoclavada e utilizadas diretamente nas reações de PCR.

As reações de amplificações foram realizadas em volumes de 25µl contendo: 12,85µl de água Milli-Q autoclavada, 2,5µl de Buffer 10x (Tris HCl - pH 8,3), 2 mM de MgCl₂, 0,8 mM de solução dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 10 µM de cada *primer*, 0,24% de Triton-X-100, 0,75U de TaqDNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen), e 4 µL de suspensão bacteriana diluída 1/40.

As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC100, programado para 10 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de um minuto a 94°C para a desnaturação das fitas do DNA, um minuto à temperaturas de 56 °C para anelamento de cada um dos *primers*, e dois minutos a 72°C para extensão das fitas do DNA. Ao final dos 35 ciclos foi feita uma extensão suplementar por 10 minutos a 72°C e as amostras mantidas por 10 minutos a 4°C.

4.10.2 Separação e visualização do segmento amplificado

Para a constatação da obtenção do fragmento correto correspondente ao gene da elastase o produto de amplificação foi submetido à eletroforese (3V/cm) em gel horizontal de agarose 1,5% em tampão TBE (89mM Tris, 89 mM de ácido bórico e 8 mM de EDTA), acrescidos de solução de brometo de etídio (30 µg/100 mL). Como tampão de corrida utilizou-se também o TBE 1X. O produto amplificado foi visualizado sob transiluminador UV. O padrão de massa molecular DNA de fago λ clivado com as enzimas de restrição

EcoRI e HindIII foi incluído nos géis para a determinação da massa molecular correta das bandas obtidas.

4.10.3 Ligação e Clonagem do gene da elastase

Para a clonagem do gene da elastase de *A. hydrophila* ATCC7966, foi utilizado o vetor pJET 1.2/blunt, com peso molecular de 2974pb. Este vetor contém o gene letal *eco47IR* que permite a seleção positiva de transformantes, além de possibilitar a clonagem direta de fragmentos de DNA provenientes de amplificação via PCR. O vetor pJET 1.2/blunt, permite a clonagem de fragmentos que variam de 6 pb a 10 Kb. Além do gene letal *eco47IR*, este vetor apresenta o gene *bla*, o qual confere aos transformantes resistência ao antibiótico ampicilina.

O procedimento de ligação e clonagem ocorreu da seguinte maneira: em um tubo tipo *Eppendorf* foram adicionados 10 µL do tampão de reação, 2 µL do produto de PCR, 5 µL de água livre de nucleases e 1µL de DNA “*blunting enzyme*”. Esta mistura foi mantida a 70°C por 5 minutos. Posteriormente 1µL de pJET 1.2/blunt e 1µL de T4 DNA ligase foram adicionados e mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos. Esta mistura foi utilizada para os procedimentos de transformação.

4.10.4 Obtenção de células competentes e transformação

Para a obtenção de células competentes foi utilizado o método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Brevemente, *E. coli* DH5α foi crescida sob agitação constante em meio LB

suplementado com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,2% de glicose até atingirem uma densidade ótica (D.O.600nm) entre 0,45 e 0,5. Posteriormente as células foram mantidas em gelo por 10 minutos e então centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida as células foram cuidadosamente ressuspensas em 500µL meio LB com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,2% de glicose resfriado, e acrescidas de 2,5 mL de uma solução contendo 36% de glicerol, 12% de PEG e 12 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. As células competentes assim obtidas foram aliquotadas em volumes de 100µL e estocadas a -80°C até o momento de sua utilização.

Para transformação as células competentes foram cuidadosamente descongeladas e mantidas em gelo. Imediatamente após o descongelamento foram adicionados 20 µL da mistura de ligação obtidas de acordo com o item 4.10.3, permanecendo por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 60 segundos e incubadas em banho de gelo por 2 minutos. As células foram diluídas 1/10 e incubadas em meio LB por 1 h a 37°C, para permitir a expressão do gene de resistência a ampicilina. Amostras de 100 µL foram plaqueadas em meio LB contendo 50µg/mL de ampicilina e incubadas por 18 h a 37°C. Os transformantes foram re-isolados e mantidos a 4°C sob pressão de seleção utilizando ampicilina.

4.11 Análises estatísticas

Dependendo da sua natureza e objetivos, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com comparação de médias através do teste de Tukey, análise multivariada com determinação de distâncias de Jaccard, análise de agrupamentos utilizando

o algoritmo UPGMA, ou análise de correlação pelo teste de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SPSS for Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade caseinolítica e gelatinolítica semi-quantitativa em *Aeromonas*

As proteases extracelulares de *Aeromonas* são apontadas como importantes fatores de patogenicidade, atuando diretamente sobre proteínas do hospedeiro ou participando na maturação de outras proteínas com atividades hemolíticas ou citotóxicas (Sakai, 1985; Santos *et al.*, 1996; Cascón *et al.*, 2000a; Song *et al.*, 2004; Nitta *et al.*, 2007). Além disso, estas enzimas são responsáveis pela capacidade de utilização de proteínas como fontes de carbono e nitrogênio, ampliando a sua possibilidade de ocupação de ambientes.

Com o objetivo de avaliar a atividade proteolítica em *Aeromonas*, 47 linhagens foram analisadas quanto à formação de halos em placas de meio LB contendo 1% de leite em pó desnatado, conforme pode ser observado na Figura 1.

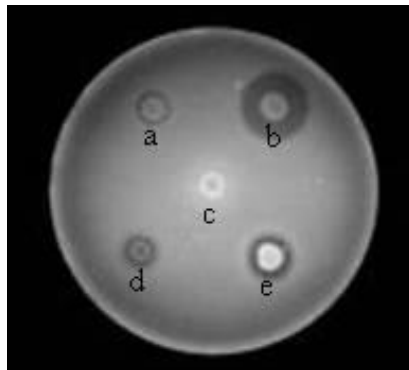


Figura 1. Atividade proteolítica semi-quantitativa em meio LB acrescido de 1% de leite em pó desnatado (molico). a-IBAer001, b-IBAer002, c-IBAer003, d-IBAer004, e-IBAer005.

A análise da relação entre o diâmetro de halos e de colônias (Tabela 4) permitiu evidenciar ampla e significativa variação na atividade caseinolítica, sendo 21,3% dos

isolados classificados como de elevada atividade, 38,3% de atividade intermediária, 23,4% de baixa atividade e 17,0% sem atividade aparente após 24 horas de cultivo.

Tabela 4. Atividade proteolítica em placas de LB com leite em pó desnatado 1% após 24h.

Isolados	Atividade caseinolítica relativa (24h) ^{*1}	Isolados	Atividade caseinolítica relativa (24h)
IBAer001	0,17±0,072 ^{op}	IBAer111	1,36±0,071 ^a
IBAer002	0,65±0,087 ^{ijklm}	IBAer112	0,49±0,034 ^{klmno}
IBAer003	0,00±0,000 ^p	IBAer113	1,13±0,062 ^{abcde}
IBAer004	0,29±0,151 ^{mnp}	IBAer114	0,63±0,057 ^{ijklmn}
IBAer005	0,38±0,052 ^{lmno}	IBAer115	1,11±0,041 ^{abcdef}
IBAer006	0,72±0,088 ^{ghijkl}	IBAer116	1,12±0,000 ^{abcde}
IBAer007	0,00±0,000 ^p	IBAer117	1,04±0,095 ^{abcdefgh}
IBAer008	0,23±0,028 ^{op}	IBAer119	1,21±0,000 ^{abc}
IBAer009	0,18±0,037 ^{op}	IBAer120	0,83±0,154 ^{defghijkl}
IBAer010	0,92±0,156 ^{bcdefghi}	IBAer141	0,00±0,000 ^p
IBAer011	0,40±0,041 ^{lmno}	IBAer142	0,00±0,000 ^p
IBAer012	0,74±0,041 ^{fghijkl}	IBAer144	0,68±0,037 ^{hijkl}
IBAer013	0,30±0,050 ^{mnp}	IBAer145	0,96±0,036 ^{bcdefghi}
IBAer014	0,44±0,109 ^{lmno}	IBAer146	0,00±0,000 ^p
IBAer015	0,61±0,037 ^{ijklmn}	IBAer150	0,96±0,036 ^{bcdefghi}
IBAer016	0,00±0,000 ^p	IBAer151	0,92±0,036 ^{bcdefghi}
IBAer017	0,26±0,088 ^{nop}	IBAer153	0,87±0,125 ^{cdefghij}
IBAer102	0,53±0,077 ^{ijklmno}	IBAer155	0,00±0,000 ^p
IBAer103	1,07±0,185 ^{abcdefg}	IBAer157	0,95±0,041 ^{bcdefghi}
IBAer105	0,89±0,095 ^{bcdefghij}	IBAer158	0,75±0,107 ^{efghijkl}
IBAer106	1,14±0,071 ^{abcd}	IBAer159	0,00±0,000 ^p
IBAer107	0,72±0,000 ^{ghijkl}	IBAer165	0,29±0,110 ^{mnp}
IBAer109	1,26±0,073 ^{ab}	IBAer167	0,75±0,083 ^{efghijkl}
IBAer110	1,17±0,148 ^{abcd}		

* Atividade relativa= (Diâmetro do halo-Diâmetro da colônia)/Diâmetro da colônia. ¹Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ($p=0,05$).

Dentre as linhagens avaliadas alguns isolados foram selecionados com base na relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro de crescimento da colônia (Tabela 4) e a atividade caseinolítica deste foi avaliada após 48h. Os resultados obtidos (Tabela 5) permitiram constatar que a maior parte dos isolados que exibiram ausência de halo com 24h (IBAer 003, IBAer 007, IBAer 016, IBAer 141, IBAer 142, IBAer 146 e IBAer 155) apresentaram halo de degradação de caseína após 48h de incubação. Entretanto, o isolado

IBAer 159 continuou exibindo ausência de atividade. A presença de atividade apenas após 48h de cultivo pode representar expressão ou secreção tardia destas enzimas, especialmente considerando que o crescimento de todas as linhagens foi muito semelhante.

Variação na atividade caseinolítica e ausência de atividade em algumas linhagens foi previamente evidenciado por Mateos *et al.* (1993) em estudo envolvendo isolados clínicos e ambientais de *A. hydrophila*. A variabilidade na atividade proteolítica extracelular é relativamente comum em distintos grupos bacterianos como mostram os trabalhos em *Pseudomonas* sp. (Alanis *et al.*, 1999), *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Pailin *et al.*, 2001), *Staphylococcus epidermidis* (Michelin *et al.*, 2005), *Bacillus cereus* (Ponmurugan, 2007), entre outros. Entretanto, nenhum trabalho prévio verificou a variação no tempo de expressão e/ou secreção destas enzimas, em placas por *Aeromonas*.

Tabela 5. Atividade proteolítica em placas de LB com leite em pó desnatado 1% após 48h.

Isolados	Atividade caseinolítica relativa (48h) ¹	Isolados	Atividade caseinolítica relativa (48h) ¹
IBAer001	0,68±0,081 ^c	IBAer141	0,51±0,236 ^{cde}
IBAer003	0,09±0,005 ^{fg}	IBAer142	0,62±0,131 ^{cd}
IBAer007	0,28±0,053 ^{efg}	IBAer146	0,30±0,086 ^{ef}
IBAer016	0,39±0,048 ^{de}	IBAer153	1,34±0,142 ^b
IBAer107	1,50±0,000 ^b	IBAer155	0,22±0,063 ^{efg}
IBAer109	2,33±0,000 ^a	IBAer159	0,00±0,000 ^g

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

Com base nos resultados obtidos em caseína, algumas linhagens representantes dos distintos grupos de comportamento (tamanho de halo e tempo de surgimento de halo) foram selecionadas para determinação de atividade gelatinolítica em placas.

Os resultados obtidos (Tabela 6) permitiram constatar uma elevada atividade gelatinolítica para os isolados IBAer 003, IBAer 107, IBAer 109, IBAer 111, IBAer 153 e IBAer 158 quando comparadas as atividades caseinolíticas. Outro fato importante observado foi que os isolados IBAer 003, IBAer 007, IBAer 016, IBAer 141, IBAer 146 e IBAer 159 que não apresentaram atividade caseinolítica após 24h, apresentaram atividade gelatinolítica após o mesmo período de incubação. Estes resultados sugerem a presença de proteases com maior especificidade por gelatina do que por caseína, secreção de proteases gelatinolíticas antes do que aquelas com atividade sobre caseína, ou ainda, maior capacidade de indução por parte da gelatina. Os únicos isolados que não apresentaram halo em gelatina foram IBAer 142 e IBAer 155.

Tabela 6. Atividade gelatinolítica em placas de LB com gelatina 0,75% após 24h.

Isolados	Atividade gelatinolítica relativa (24h) ¹	Isolados	Atividade gelatinolítica relativa (24h)
IBAer001	0,54±0,036 ^d	IBAer111	1,41±0,178 ^{ab}
IBAer003	1,09±0,076 ^c	IBAer141	0,19±0,073 ^{ef}
IBAer007	0,50±0,000 ^d	IBAer142	0,00±0,000 ^f
IBAer009	0,83±0,036 ^{cd}	IBAer146	0,48±0,032 ^{de}
IBAer016	0,44±0,096 ^{de}	IBAer155	0,00±0,000 ^f
IBAer107	1,69±0,063 ^a	IBAer158	1,47±0,216 ^{ab}
IBAer109	1,56±0,046 ^{ab}	IBAer159	0,33±0,048 ^{de}

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

Diferenças entre atividade caseinolítica e gelatinolítica através da avaliação de halo em placas foram verificadas em outros grupos bacterianos, conforme mostram os resultados obtidos por Alanis *et al.* (1999) num estudo envolvendo isolados de *Pseudomonas* sp. Assim como no presente trabalho, estes autores verificaram maior atividade sobre gelatina do que sobre caseína. Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho discordam daqueles

relatados por Leung & Stevenson (1988), que evidenciaram maior atividade sobre caseína do que sobre gelatina por parte das proteases extracelulares de duas linhagens de *A. hydrophila*. Cabe ressaltar que estes autores não citam os dados e o método empregado, dificultando a comparação.

Visando aumentar a precisão da análise de atividade proteolítica extracelular, foi realizada a determinação da atividade de extratos brutos correspondentes ao sobrenadante após crescimento dos 47 isolados de *Aeromonas* em meio LB a 37°C com agitação constante por 24h.

Conforme mostram os resultados da Tabela 7, ampla e significativa variação entre isolados foi observada na atividade proteolítica sobre azocaseína, sendo a maior atividade de 38,61 U/ml para o isolado IBAer 109 de *A. hydrophila* obtido de amostra clínica de paciente diarreico e a menor atividade 3,67 U/ml para o isolado IBAer016 de *A. eucrenophila*. Comparação entre as atividades obtidas em placa (halo de degradação) com caseína e as atividades caseinolíticas dos extratos mostrou uma fraca correlação, mas positiva com $r=0.445$ ($n=47$, $sign=0.01$).

A atividade caseinolítica dos isolados de *Aeromonas hydrophila* foi significativamente maior ($14,66 \pm 8,33$ U/ml) do que *A. caviae* ($7,00 \pm 1,74$ U/ml) e outras espécies de *Aeromonas* ($6,29 \pm 2,72$ U/ml). Por outro lado, apesar das proteases extracelulares serem consideradas importantes fatores de patogenicidade em *Aeromonas* (Chacón *et al.*, 2003), não foram constatadas diferenças significativas na atividade proteolítica total entre isolados clínicos e ambientais de *A. hydrophila* e de *A. caviae*. Esta aparente discordância deve ser tomada com cautela, considerando que apenas algumas

proteases apresentam correlação com a virulência em *Aeromonas*, estas bactérias produzem um conjunto de proteases extracelulares, e cada protease possui substratos preferenciais.

Tabela 7. Atividade caseinolítica de extratos brutos de 47 isolados de *Aeromonas*.

Isolados	Atividade sobre Azocaseína ¹	Isolados	Atividade sobre Azocaseína
IBAer001	4,58±0,64 ^{vx}	IBAer111	15,78±1,00 ^{fg}
IBAer002	13,70±2,00 ^{ghi}	IBAer112	22,24±0,11 ^{cd}
IBAer003	5,20±0,11 ^{rstuvx}	IBAer113	13,03±0,17 ^{hij}
IBAer004	5,87±0,94 ^{qrstuvx}	IBAer114	24,32±0,35 ^c
IBAer005	10,32±0,17 ^{klm}	IBAer115	15,95±0,29 ^{ef}
IBAer006	4,91±0,41 ^{stuvx}	IBAer116	18,11±0,76 ^e
IBAer007	7,03±0,00 ^{pqrst}	IBAer117	5,26±0,05 ^{rstuvx}
IBAer008	4,83±0,05 ^{tuvx}	IBAer119	10,66±0,70 ^{kl}
IBAer009	5,12±0,70 ^{rstuvx}	IBAer120	14,86±0,17 ^{fgh}
IBAer010	12,95±0,35 ^{hij}	IBAer141	7,20±0,05 ^{opqr}
IBAer011	5,33±0,05 ^{rstuvx}	IBAer142	6,87±0,05 ^{pqrstu}
IBAer012	11,28±1,06 ^{jk}	IBAer144	6,91±0,11 ^{pqrstu}
IBAer013	4,83±0,05 ^{tuvx}	IBAer145	20,78±0,76 ^d
IBAer014	5,49±0,29 ^{rstuvx}	IBAer146	9,78±0,76 ^{klmn}
IBAer015	4,70±0,00 ^{uvx}	IBAer150	10,99±0,11 ^{jk}
IBAer016	3,66±0,17 ^x	IBAer151	14,70±0,05 ^{fgh}
IBAer017	4,019±0,32 ^x	IBAer153	7,78±0,05 ^{nopq}
IBAer102	5,70±0,17 ^{qrstuvx}	IBAer155	8,12±0,29 ^{mnp}
IBAer103	5,58±0,70 ^{qrstuvx}	IBAer157	15,61±0,05 ^{fg}
IBAer105	5,78±0,17 ^{qrstuvx}	IBAer158	11,53±0,05 ^{ijk}
IBAer106	5,58±0,35 ^{qrstuvx}	IBAer159	8,53±0,05 ^{lmnop}
IBAer107	9,37±0,05 ^{klmno}	IBAer165	7,08±0,11 ^{pqrs}
IBAer109	38,60±0,88 ^a	IBAer167	29,77±0,29 ^b
IBAer110	6,33±0,58 ^{pqrstuv}		

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

Com base na sua atividade proteolítica extracelular, e considerando sua origem clínica, o isolado IBAer 109 de *A. hydrophila* foi selecionado para determinação do efeito de potenciais indutores e repressores sobre a atividade proteolítica extracelular, a avaliação da produção de proteases extracelulares durante o crescimento e a caracterização da atividade proteolítica extracelular devida a metaloproteases.

Visando avaliar o efeito de fontes de carbono, nitrogênio e gelatina sobre a produção de proteases extracelulares, foi inicialmente avaliado o crescimento de IBAer 109 em meio mínimo (M9) contendo glicerol e acetato como fontes de carbono, sendo definido o primeiro como mais favorável ao crescimento desta bactéria, dados que corroboram com aqueles obtidos por Riddle *et al.* (1981). Assim sendo, os resultados seguintes foram obtidos em meio M9 com 0,42% de glicerol acrescido de distintos componentes.

Conforme pode ser observado na Figura 2.A, a geletina exerce um efeito indutor sobre a produção de proteases extracelulares em *A. hydrophila* IBAer 109, com aumento proporcional a concentração de gelatina adicionada no meio de cultivo. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Litchfied & Prescott (1970) e por O'Reilly & Day (1983), indicando que a produção de proteases extracelulares por *Aeromonas* ocorre em nível basal de expressão, podendo ser induzido positivamente por proteínas. Segundo Riddle *et al.* (1981) e confirmado por O'Reilly & Day (1983) e Sakai (1985), distintas fontes proteicas e alguns aminoácidos apresentam papel indutor na produção de proteases extracelulares, enquanto outros, dependendo da sua composição, podem levar a repressão na síntese destas enzimas. Segundo O'Reilly & Day (1983), fontes complexas de nitrogênio variam na concentração de aminoácidos livres, pequenos peptídios e aminoácidos liberados após hidrólise, de tal forma que variações importantes podem ser observadas na capacidade indutiva de distintas proteínas integras ou hidrolizadas.

Por outro lado, a presença de glicose no meio de cultivo levou a uma redução significativa da atividade proteolítica extracelular (Figura 2.B), sendo esta da ordem de 69% na presença de 0,1% de glicose e de 90% em meio com 0,5% de glicose.

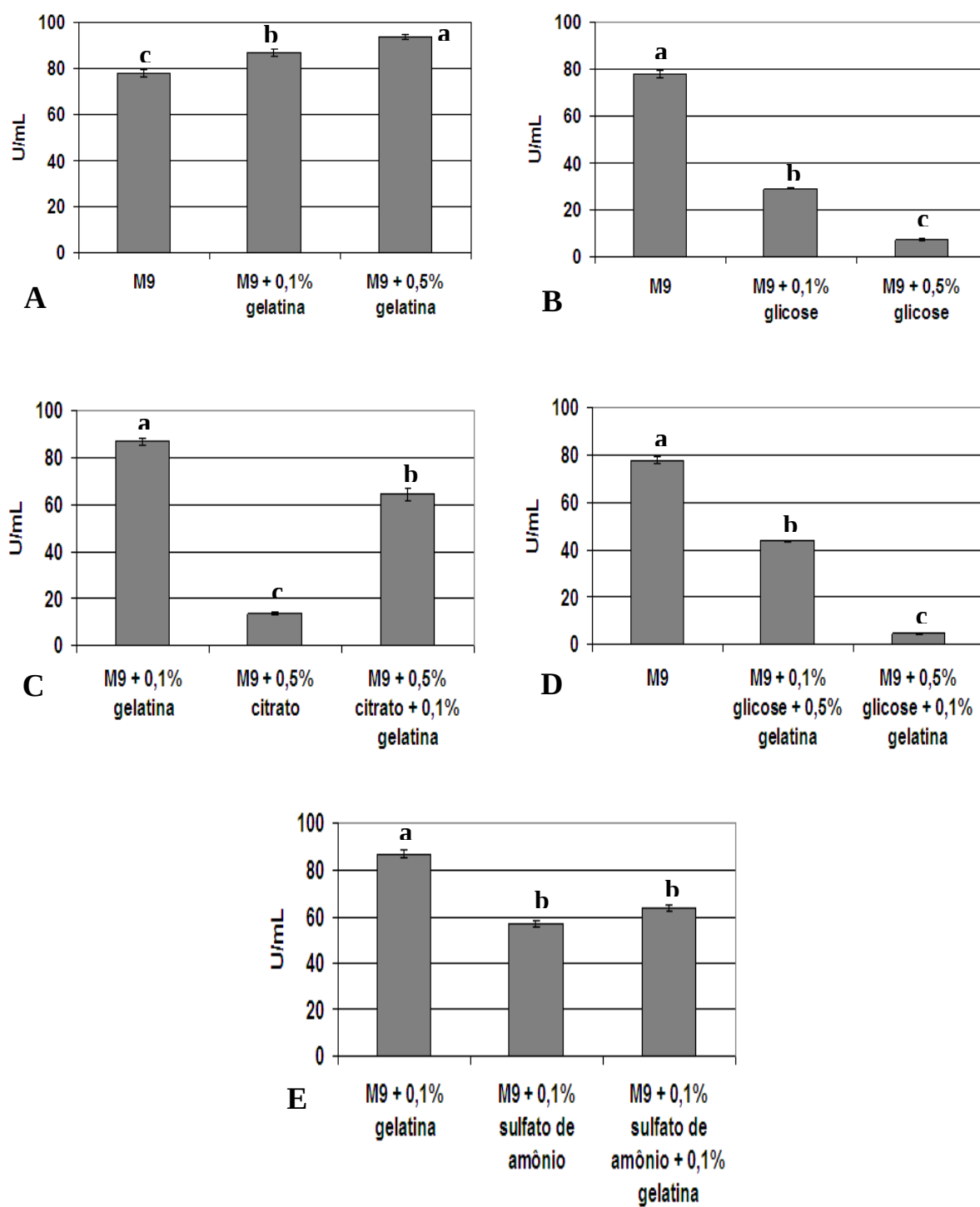


Figura 2. Efeito de gelatina (A), glicose (B), citrato (C), glicose e gelatina (D) e amônio (E) sobre a produção de proteases extracelulares de *A. hydrophila* IB Aer 109.

Esta redução poderia estar associada a repressão catabólica por glicose. Entretanto, como mostram os resultados da Figura 2.C, o citrato também leva a importante redução (79%) da atividade proteolítica extracelular. Segundo O'Reilly & Day (1983), a uma relação inversa entre produção de proteases extracelulares e o crescimento bacteriano em fontes facilmente assimiláveis, fato que poderia estar associado à concentração intracelular de ATP ou cAMP, ou ainda à redução de pH. Resultados a este respeito, obtidos em *Aeromonas* (Merkel *et al.*, 1964), *Vibrio* spp. (Wiersma *et al.*, 1978) e *A. hydrophila* (O'Reilly & Day, 1983) são contraditórios, indicando que a resposta é específica de cada espécie e eventualmente, cada linhagem bacteriana.

A presença de gelatina, que conforme resultados apresentados na Figura 2.A, tem efeito indutor na produção de proteases extracelulares, consegue reverter parcialmente o efeito inibidor do citrato (Figura 2.C) e da glicose (Figura 2.D).

A adição de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio levou a uma redução (25%) significativa da atividade proteolítica, independente da presença ou ausência do indutor gelatina (Figura 2.E). Redução da atividade proteolítica extracelular da mesma ordem (26%) foi obtida por O'Reilly & Day (1983) utilizando NH_4Cl (50mM). Estes autores mostraram que concentrações maiores (100 mM) de cloreto de amônio reduzem em 66% da atividade proteolítica, podendo chegar a inibição completa quando utilizado como única fonte de nitrogênio. Cabe ressaltar que o amônio não tem efeito inibidor sobre a atividade das proteases pré-formadas, sendo portanto um repressor catabólico da produção das mesmas.

A curva de crescimento e atividade proteolítica extracelular de IBAer 109 (Figura 3 A) mostra que a atividade aumenta a partir do momento em que o crescimento bacteriano

atinge o final da fase exponencial. Uma relação entre atividade e crescimento (Figura 3.B) evidencia este comportamento, compatível com regulação por “quorum sensing”. Swift *et al.* (1999), estudando mutantes insercionais dos genes AhyI e AhyR mostraram que a atividade proteolítica extracelular em *A. hydrophila* AH-1N é controlada por “quorum sensing”, sendo dependente da produção e acúmulo de N-butanoil-L-homoserina lactona. Estes autores constataram que tanto a atividade de serino quanto de metaloproteases é afetada pela densidade celular, produção de homoserina lactona e expressão do gene AhyR (homólogo a LuxR).

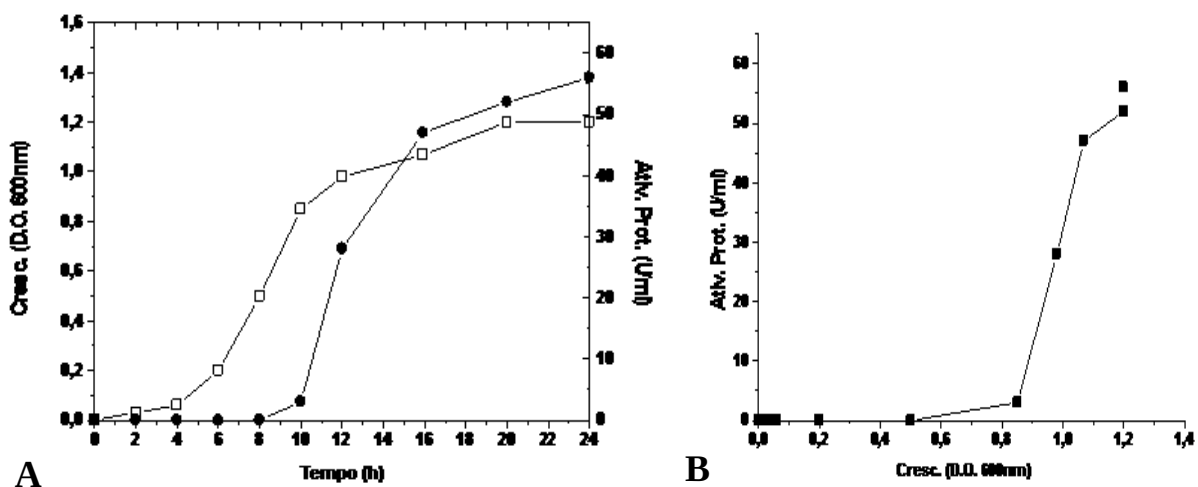


Figura 3. Crescimento (□) e produção de proteases extracelulares (●) por *A. hydrophila* IBAer 109 (A) e produção de proteases em função da densidade celular (B).

As bactérias do gênero *Aeromonas* secretam um complexo de enzimas proteolíticas, incluindo serino proteases, metaloproteases e outros grupos de proteases. Algumas destas enzimas, em particular a elastina (metaloprotease) e uma serino protease de aproximadamente 60 kDa, tem sido associadas à patogenicidade de *Aeromonas* (Sakai, 1985;

Ellis & Stapleton, 1988; Leung & Stevenson, 1988; Cascón *et al.*, 2000a). Conforme dados obtidos pela inibição de metaloproteases com EDTA (10 mM), a atividade de metaloproteases extracelulares de IBAer 109 sobre azocaseína corresponde a 27,7% da atividade proteolítica total. Este resultado é semelhante aquele obtido por Swift *et al.* (1999). Porém, segundo Leung e Stevenson (1988), a atividade de metaloproteases pode variar consideravelmente entre isolados (9,7% para ATCC7966, 48,7% para Ba5, e 77,7% para NRC505).

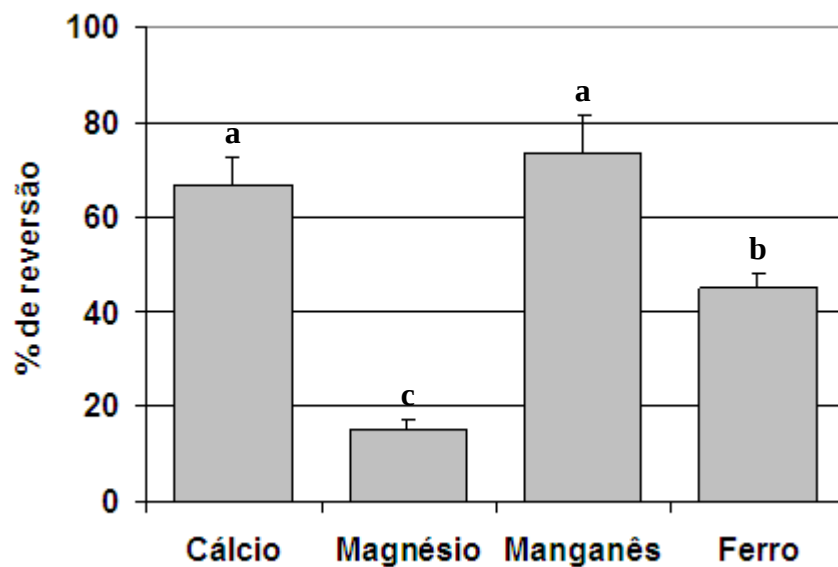


Figura 4. Reversão do efeito inibitório do EDTA sobre a atividade de metaloproteases extracelulares pela adição de distintos cátions (10 mM).

O EDTA inibe a atividade de metaloproteases, pois atua como quelante seqüestrando cátions associados ao sítio ativo destas enzimas. Esta inibição é reversível através da adição de cátions acima da capacidade quelante do EDTA. Assim sendo, foi avaliada a capacidade de distintos cátions (cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco e cobalto) reverterem a inibição das metaloproteases de IBAer 109 por EDTA. Os sais de zinco e cobalto apresentam

coloração amarela e rosa, respectivamente, impedindo a avaliação. Os outros cátions reverteram de forma parcial a atividade de metaloproteases (Figura 4) variando entre 73,33% e 66,67% no caso de manganês e cálcio, e 44,8% e 15,13% quando adicionados ferro e magnésio.

5.2 Variabilidade nos perfis de proteases extracelulares de *Aeromonas*

Diversos trabalhos mostram que as bactérias do gênero *Aeromonas* secretam um complexo proteolítico formado por metalo, serino e outras proteases, as quais estão envolvidas na utilização de proteínas durante o crescimento saprofítico, com importante papel também nos processos infecciosos (Sakai, 1985; O'Reilly & Day, 1983; Santos *et al.*, 1996; Swift *et al.*, 1999; Cascón *et al.*, 2000a). Considerando a importância das proteases e a ausência de estudos comparativos, passamos a avaliar a diversidade de proteases extracelulares em 47 isolados de distintas espécies de *Aeromonas* através de zimogramas. Para tanto, os isolados foram crescidos em meio LB (20 h) e seus extratos brutos extracelulares foram submetidos a separação eletroforética em géis SDS-PAGE co-polimerizados com gelatina ou caseína.

Considerando todos os isolados, os zimogramas com gelatina permitiram a identificação de 13 bandas com massa moleculares estimados entre 22 e 94 KDa, com grande diversidade entre espécies, conforme pode ser apreciado no exemplo da Figura 5.

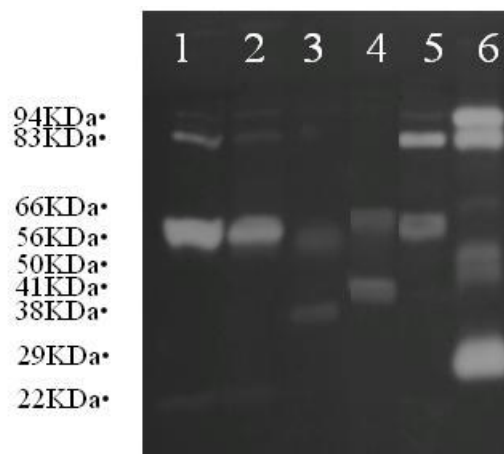


Figura 5. Representação do perfil de proteases extracelulares utilizando gelatina como substrato. 1-IBAer012; 2-IBAer109; 3- IBAer008; 4-IBAer004; 5-IBAer010; 6-IBAer015

Considerando os 23 representantes de *Aeromonas hydrophila*, foi evidenciado um total de 7 bandas, como massas moleculares de aproximadamente 94, 83, 58, 56, 49, 31 e 22 KDa. Com base nestas bandas cinco perfis proteolíticos foram bem estabelecidos. O primeiro perfil caracteriza-se por apresentar bandas com massas moleculares de aproximadamente 22, 56 e 83, com presença variável da banda de 94 KDa, sobressaindo a atividade das proteases de 83 e 56 KDa. O segundo perfil foi caracterizado por apresentar bandas com massas moleculares de 22, 49, 56, 83 e 94 KDa, com alta atividade nas bandas de 49 e 56 KDa. O terceiro perfil apresentou bandas com pesos moleculares de 22, 49, 56 e 83 KDa, com bandas intensas de 49 e 56 KDa. O quarto perfil foi caracterizado por apresentar bandas com massas de 56, 83 e 94 KDa, com elevada atividade na banda de 56 KDa. O quinto perfil caracterizou-se pela ausência de bandas de alto peso molecular. Variação em perfis de proteases entre dois isolados de *A. hydrophila*, incluído bandas de pesos moleculares semelhantes aos do presente trabalho, foram obtidos por Santos *et al.* (1996).

De acordo com os resultados, todos os isolados clínicos e ambientais de *A. hydrophila* apresentaram uma protease de massa molecular aparente de 56 KDa sugerindo que esta

enzima apresenta uma elevada importância para estas bactérias. Considerando que em zimogramas não ocorre desnaturação completa da enzima, esta protease pode corresponder a uma serino protease de 65-70 kDa relatada em *A. hydrophila* (Leung & Stevenson, 1988; Rivero *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 2003), *A. sobria* (Kobayashi *et al.*, 2006) e *A. salmonicida* (Whitby *et al.*, 1992).

Para *Aeromonas caviae*, vários perfis proteolíticos foram estabelecidos. Entretanto, 8 dos 11 representantes desta espécie apresentaram dois perfis: o primeiro representado por bandas com massa molecular de aproximadamente 38 e 50 KDa e o segundo caracterizado pela presença de bandas com massa molecular de 41 e 66 KDa. A presença de uma protease de 34KDa foi relatada por Toma *et al.* (1999) em *A. caviae*.

As outras espécies de *Aeromonas* avaliadas apresentaram perfis proteolíticos variados, o que em conjunto com os resultados obtidos em *A. hydrophila* e *A. caviae*, evidenciam elevada diversidade intra e interespecífica de proteases extracelulares no gênero *Aeromonas*.

A análise de agrupamentos (UPGMA) baseada nos zimogramas permitiu a separação de sete grupos com ponto de corte arbitrário em 0,38 (Figura 6). O grupo maior foi formado por 31 linhagens, sendo 23 pertencentes a *A. hydrophila*, correspondente a 100% das linhagens desta espécie, dois representantes de *A. sobria*, três linhagens de *A. caviae*, e os representantes de *Aeromonas sp.*, *A. allosaccharophila* e *A. eichrenophila*. O segundo grupo foi composto por seis linhagens incluindo, quatro linhagens de *A. caviae*, um isolado de *A. trota* e um isolado de *A. media*.

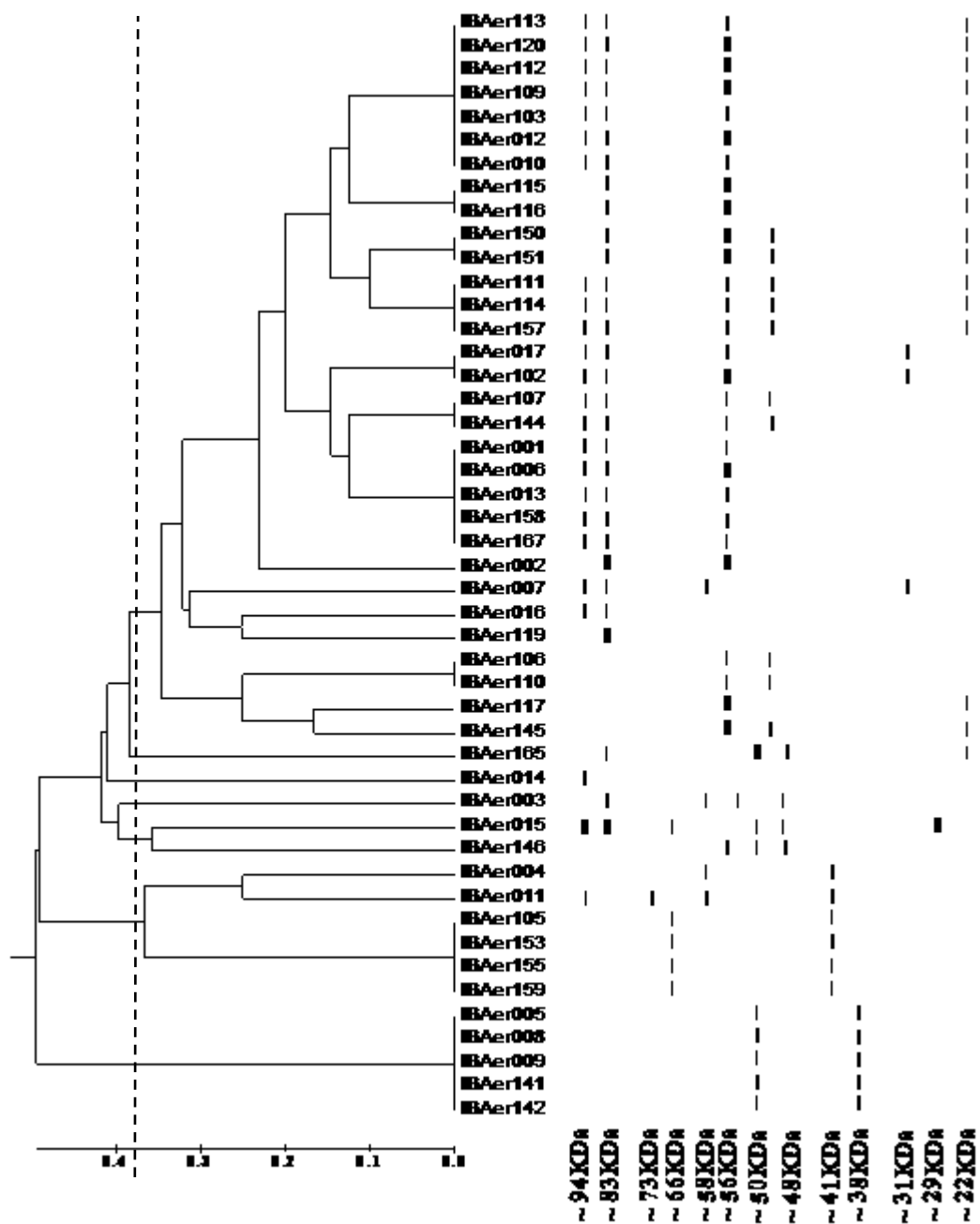


Figura 6. Análise de agrupamento (UPGMA) de distintas *Aeromonas* baseado no perfil de atividade gelatinolítica, esquema das bandas e suas massas moleculares estimadas.

O terceiro grupo, com cinco linhagens apresentou quatro *A. caviae* e uma *A. salmonicida*. Os outros grupos foram formados por uma ou duas linhagens.

Apenas 36 dos 47 isolados avaliadas apresentaram bandas em zimogramas realizados com caseína co-polimerizada. Os isolados IBAer 001, IBAer 003, IBAer 014, IBAer 016, IBAer 017, IBAer 103, IBAer 141, IBAer 142, IBAer 155, IBAer 159 e IBAer 165 que não apresentaram bandas detectável em gel exibiram atividades caseinolíticas baixas (Tabela 7).

De um modo geral, os perfis obtidos apresentaram menor número de bandas do que em gelatina. Em total, sete bandas foram identificadas, com pesos moleculares variando entre 22 e 83 KDa e intensidade variada. Os perfis de alguns isolados podem ser apreciados na Figura 7.



Figura 7. Representação do perfil de proteases extracelulares utilizando caseína como substrato. 1-IBAer012; 2-IBAer109; 3- IBAer008; 4-IBAer004; 5-IBAer010; 6-IBAer015

A análise dos géis de atividade caseinolítica permitiu a caracterização de distintos perfis. Nos representantes de *A. hydrophila* foi detectado um total de cinco bandas com massas moleculares de aproximadamente 22, 38, 48, 50 e 56 KDa. Dos 22 isolados de *A. hydrophila* com bandas detectáveis em caseína, dez apresentaram perfil caracterizado por

bandas com pesos moleculares de 22 e 56 KDa, quatro exibiram perfil composto por bandas de 22, 38, 50 e 56 KDa, quatro perfil constituído por bandas de 22, 38 e 56 KDa, e os outros três isolados exibiram perfis com a presença de banda de 48 KDa. A banda de 56 KDa detectada em gelatina em praticamente todos os representantes de *A. hydrophila*, não foi visualizada nos isolados IBAer 007, IBAer 013, IBAer 103, IBAer 106 e IBAer 144, o que pode estar associado à baixa atividade caseinolítica da enzima produzida por estes isolados. Conforme discutido anteriormente (pg. 44), a protease de 56 KDa pode corresponder à serino protease de 65-70KDa descrita em várias espécies de *Aeromonas*, incluído *A. hydrophila*.

Dos sete isolados de *A. caviae* com atividade caseinolítica detectada em géis, cinco apresentaram apenas uma banda de 38 KDa, e três com bandas de 22 e 38 KDa, 48 e 50 KDa e 38, 50 e 56 KDa, respectivamente. A banda de 38 KDa, apresenta massa molecular compatível com uma protease termo-estável (38 KDa) descrita por Rivero *et al.* (1990) em *A. hydrophila* e uma metaloprotease (34K Da) descrita por Toma *et al.* (1999) em um isolado de *A. caviae*.

A análise de agrupamentos (UPGMA) baseada nos zimogramas permitiu a separação de quatro grupos com ponto de corte arbitrário em 0,30 (Figura 8). O grupo maior foi formado por 22 isolados, sendo 18 pertencentes a *A. hydrophila*, correspondente a 78% das linhagens desta espécie, um representantes de *A. sobria*, um de *Aeromonas* sp. e dois de *A. caviae*. O segundo grupo foi formado por seis isolados, sendo cinco de *A. caviae* e um de *A. sobria*. O terceiro caracterizado pela presença de banda de 48 KDa foi formado por três *A. hydrophila*, uma *A. hydrophila punctata* reclassificada e tida como *A. caviae*, uma *A. salmonicida* e uma *A. veronii* var. *sobria*. O quarto grupo foi formado por apenas dois isolados, um de *A. trota* e outro de *A. media*.

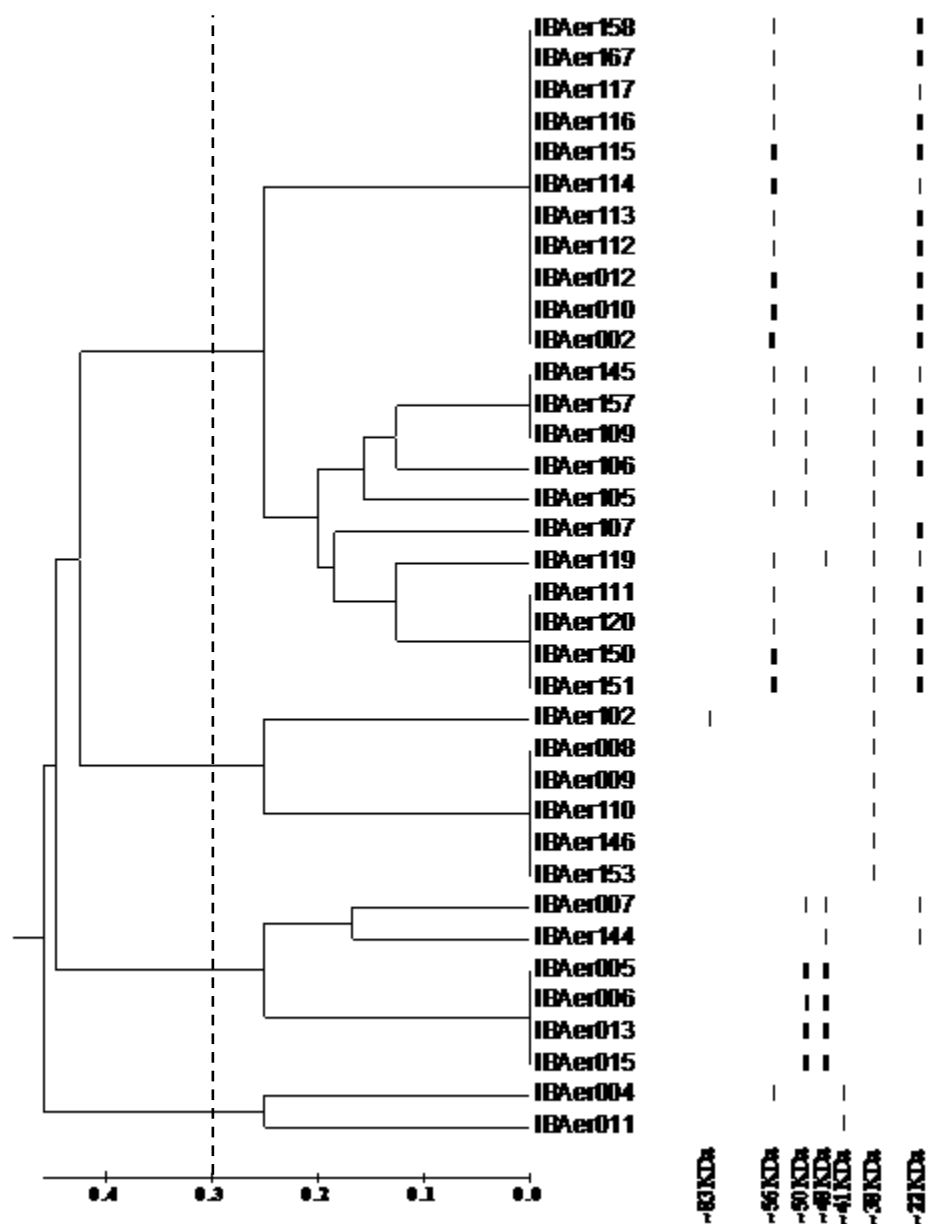


Figura 8. Análise de agrupamento (UPGMA) de distintas *Aeromonas* baseado no perfil de atividade caseinolítica, esquema das bandas e suas massas moleculares estimadas.

Muitos são os métodos empregados para avaliar a atividade de proteases extracelulares. Na análise de zimogramas é possível uma avaliação semi-quantitativa direta da atividade das várias enzimas proteolíticas, enquanto que empregando substratos específicos e analisando a quebra e liberação de moléculas marcadas é possível uma avaliação quantitativa da atividade proteolítica total sobre o substrato utilizado.

A correlação entre a atividade proteolítica em gel e atividade proteolítica utilizando azocaseína foi estabelecida. Para a análise foram comparados a soma das áreas padronizadas de degradação de proteases extracelulares obtidos em géis empregando caseína como substrato, e as atividades proteolíticas quantitativas obtidas mediante o método de azocaseína (Bonato *et al.*, 1982).

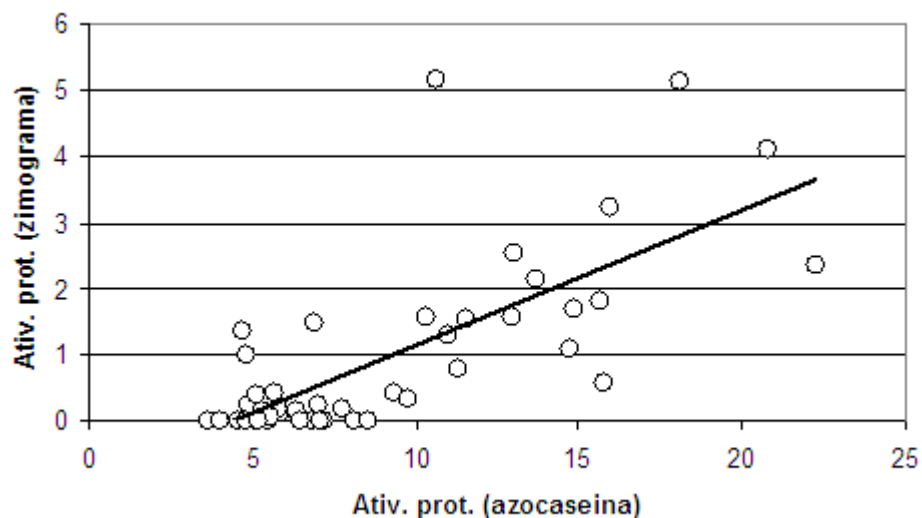


Figura 9. Relação entre a atividade caseinolítica avaliada pela hidrólise de azocaseína (U/mL) e pelo somatório das áreas padronizadas (pixel) das bandas detectadas em géis contendo caseína.

A análise de correlação indicou uma correlação significativa de 0,765 em um nível de significância de $p= 0,01$ entre os dois métodos empregados evidenciando uma boa congruência (Figura 9). Cabe ressaltar que na análise anterior os dois isolados com maior atividade (IBAer 109 e IBAer 167) foram excluídos, pois quando a atividade é muito elevada a integração de áreas apresenta fuga da linearidade.

A comparação dos resultados obtidos pela análise de zimogramas em gelatina e caseína evidencia diferenças importantes na especificidade por substrato das distintas proteases que compõem o complexo proteolítico extracelular de *Aeromonas*, com enzimas capazes de atuar sobre os dois substratos como aquela representada por banda de 56 KDa e outras com atividade apenas sobre gelatina, como a protease de 94 KDa.

5.3 Caracterização de proteases extracelulares em *Aeromonas*

Com base nos grupos de proteases extracelulares observados nos géis os isolado IBAer 004, IBAer 007, IBAer 008, IBAer 010, IBAer 011, IBAer 012, IBAer 015, IBAer 109, IBAer 151 e IBAer 153 foram selecionados para a caracterização de serino e metaloproteases e determinação da especificidade de proteases extracelulares frente a distintos substratos.

5.3.1 Determinação de serino e metaloproteases extracelulares em *Aeromonas*

As proteases extracelulares são geralmente classificadas em quatro grupos de acordo com a constituição geral de seu sítio ativo: serino proteases, metaloproteases, aspártico

proteases e cisteino proteases. Visando caracterizar as diferentes proteases extracelulares os géis de gelatina foram tratados com 10 mM de EDTA ou 1 mM de PMSF. O EDTA atua como agente quelante de íons divalentes inibindo a atividade de metaloproteases. Por outro lado, o PMFS atua ligando-se permanentemente a serina presente no sitio das serino proteases, inibindo estas enzimas.

Utilizando EDTA como inibidor, constatou-se completa inibição de bandas com peso moleculares de 83 e 94 KDa para os isolados IBAer 012 e IBAer 109. Uma inibição consistente, porém não total foi observada para estas mesmas bandas nos isolados IBAer 007, IBAer 010 e IBAer 015. Já para o isolado IBAer 015, percebeu-se ainda uma inibição parcial de bandas com pesos moleculares de 29, 48, 50 e 66KDa (Figura 10). Com base nestes resultados estas enzimas podem ser caracterizadas como proteases pertencentes ao grupo das metaloproteases. A inibição parcial de algumas bandas provavelmente esta associada à concentração de EDTA empregada visto que sua capacidade quelante esta relacionada com a concentração de íons divalentes que compõem o sitio ativo de cada enzima.



Figura 10. Atividade proteolítica em géis de poliacrilamida co-polimerizados com gelatina. A- Gel sem tratamento; B- Gel tratado com 10mM EDTA; C- Gel tratado com 1mM PMSF. 1- IBAer 012; 2- IBAer 109; 3- IBAer 008; 4- IBAer 011; 5- IBAer 004; 6- IBAer 153; 7- IBAer 007; 8- IBAer 010; 9- IBAer 015; 10- IBAer 151.

As metaloproteases extracelulares identificadas em *Aeromonas* limitam-se a uma zinco-metaloprotease de 19 KDa (Loewry *et al.*, 1993), a elastase de 62,7 KDa (Cascón *et al.*, 2000) e três metaloproteases termoestáveis de 31, 44, e 60 KDa detectadas numa linhagem virulenta de *A. hydrophila*. Comparado com os resultados obtidos no presente trabalho, apenas as bandas identificadas em IBAer 015 coincidem com algumas destas metaloproteases. Análise do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 permitiu a identificação de diversas metaloproteases, mas apenas uma com massa molecular estimado de 85 KDa (YP 855522) que poderia explicar a banda de 83 KDa evidenciada em IBAer 012 (ATCC7966), IBAer 007, IBAer 010, IBAer 015 e IBAer 109. Por outro lado, Leung e Stevenson (1988) apontaram a possibilidade de ocorrência de dimerizações, que poderiam explicar as bandas de alto peso (83 e 94 KDa) observadas no presente trabalho.

Quando empregado PMFS como inibidor, foi constatada a completa inibição de uma única banda com massa molecular de 56 KDa nos isolados IBAer 012, IBAer 109, IBAer 010 e IBAer 151, sendo esta assim caracterizada como uma protease pertencente ao grupo das serino proteases. Esta serino-protease apresenta peso molecular compatível com a serino-protease encontrada na linhagem virulenta EO63 de *A. hydrophila* (Esteve & Birbeck, 2004), aquela evidenciada por Okamoto *et al.* (2000) em *A. sobria*, entre outras *Aeromonas* (Leung e Stevenson, 1988; Rivero *et al.*, 1990; Whitby *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2006). Porém, não foram detectadas serino-proteases de baixa massa molecular (22 KDa) previamente identificadas por Rodriguez *et al.* (1992). É interessante notar que a análise do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 (Seshadri *et al.*, 2006), representada neste trabalho por IBAer 012, não permitiu constatar a presença de serino-protease de 56 KDa, mas

sim de serino-proteases extracelulares de 41, 66 e 83 KDa, não identificadas no zimograma desta linhagem.

A análise dos géis permitiu ainda a detecção de proteases que não sofreram inibição por EDTA ou PMSF. Estas podem representar aspartico proteases e cisteino proteases, ou ainda serino proteases não inibidas pelo PMSF, fato constatado em algumas proteases extracelulares bacterianas (Rao *et al.*, 1998). Considerando as proteases anotadas no genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 e comparando-as com os perfis obtidos, algumas serino-proteases de 38, 41 e 49 KDa poderiam representar a serino-protease alcalina extracelular (YP857952), a Tonin serino-protease (YP857819) e a serino-protease DegQ (YP858347).

5.3.2 Especificidade por substratos em proteases extracelulares de *Aeromonas*

Apesar da importância atribuída a algumas proteases extracelulares de *Aeromonas*, apenas trabalhos relacionados à atividades caseinolíticas, elastolíticas e de collagenase tem sido realizados em espécies deste gênero (Cascón *et al.*, 2000a e b; Han *et al.*, 2008).

No presente trabalho gelatina, caseína, ovoalbumina, elastina, γ -globulina, fibrinogênio, colágeno e albumina bovina (fração V) foram utilizados como substratos (Figura 11). A avaliação dos géis co-polimerizados com ovoalbumina, albumina bovina e γ -globulina permitiram a detecção de bandas nas bactérias IBAer 010, IBAer 012, IBAer 015 e IBAer 109. Em IBAer 010, IBAer012 e IBAer109 foram identificadas duas bandas com massas moleculares de 22 e 56KDa, enquanto a linhagem IBAer015 apresentou uma única banda com baixa atividade de 48 KDa sobre ovoalbumina e γ -globulina (Figura 11). De um modo geral, a atividade das proteases extracelulares destes quatro isolados foram menores sobre γ -globulina do que sobre as albuminas.

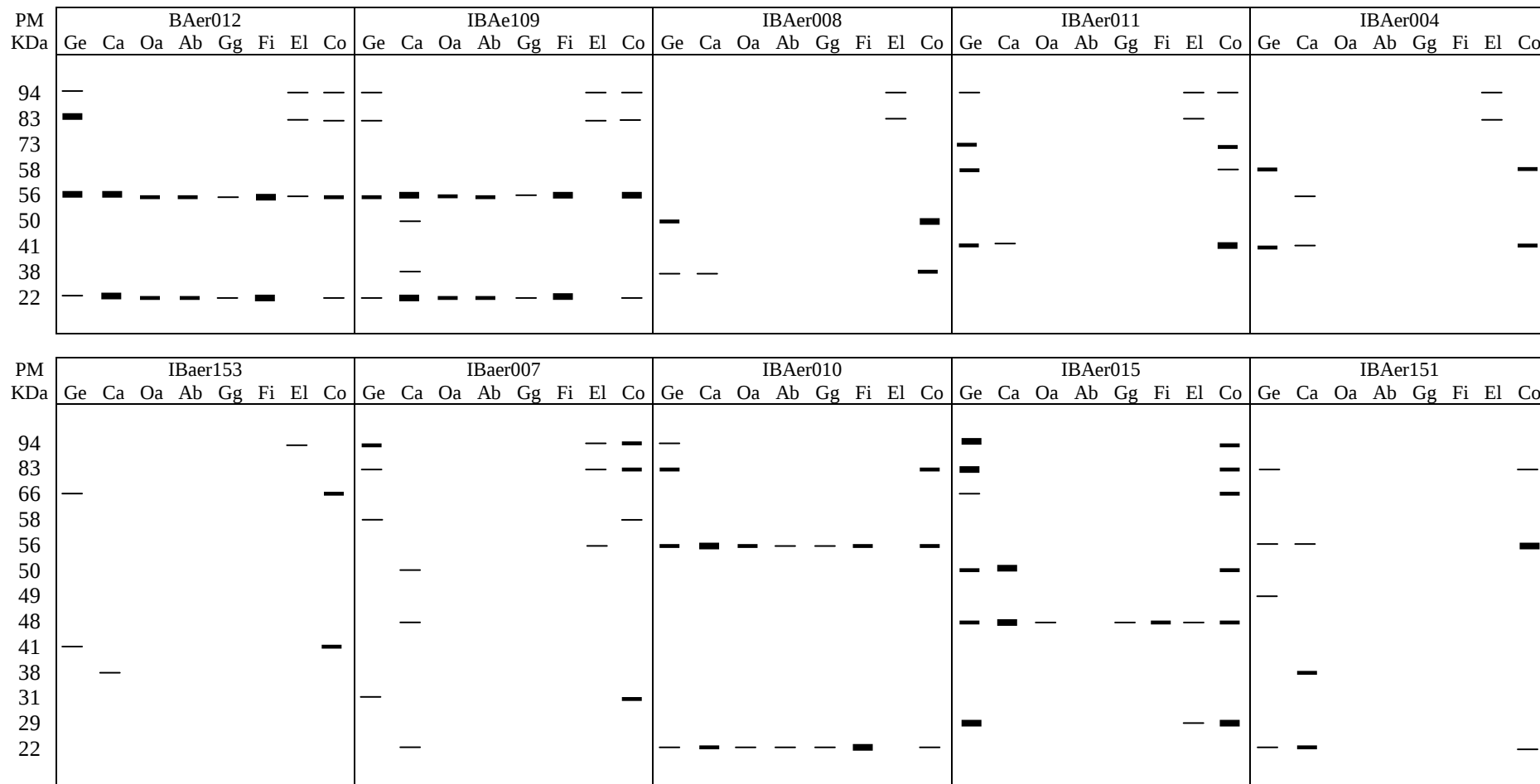


Figura 11- Esquema do perfil de proteases extracelulares de *Aeromonas* sobre distintos substratos.

Ge- gelatina, Ca- caseína, Oa- ovo albumina, Ab- albumina bovina, Gg- gama-globulina, Fi- fibrinogênio, El- elastina, Co- colágeno.

Nos géis contendo fibrinogênio (Figura 11), bandas características de protease foram detectadas nas bactérias IBAer 010, IBAer 012, IBAer 015 e IBAer 109. Bandas com massas molecular de 22 e 56 KDa detectadas nas bactérias IBAer 010, IBAer 012 e IBAer 109 apresentaram maior atividade, quando comparadas à banda de 48 KDa característica do isolado IBAer 015.

Em géis co-polimerizados com colágeno (Figura 11), uma grande diversidade de bandas com massas moleculares variando de 22 a 94 KDa foram detectadas. Todas as bactérias avaliadas apresentaram bandas com atividade sobre colágeno. As atividades proteolíticas detectadas em géis empregando colágeno como substrato mostraram-se, de um modo geral, maiores quando comparadas com bandas do mesmo peso molecular detectadas em outros substratos, inclusive gelatina, produto derivado do próprio colágeno. Uma collagenase foi reportada até o momento em *A. veronii* (Han *et al.*, 2008).

Em géis empregando caseína como substrato (Figura 11), bandas com massas moleculares entre 22 e 56 KDa foram detectadas. Já, em géis co-polimerizados com elastina, todas as bactérias, com exceção da bactéria IBAer 151, apresentaram atividade proteolítica. Para os isolados IBAer 007 e IBAer 012 três bandas com pesos moleculares de 56, 83 e 94 KDa foram detectadas. Para os isolados IBAer 004, IBAer 008, IBAer 011e IBAer 109, bandas com massa molecular de 83 e 94Kda foram identificadas. Para o isolado IBAer 015 duas bandas ativas contra elastina de 29 e 48 KDa foram observadas, e o isolado IBAer 153 apresentou uma única banda ativa contra elastina com 94 KDa. A atividade elastolítica em *Aeromonas* tem sido associada a uma serino-protease de aproximadamente 56 KDa (Cascón *et al.*, 2000b) e a uma metaloprotease (elastase) de 38 KDa (Cascón *et al.*, 2000a).

5.4 Clonagem do gene *ahyB* de *A. hydrophila* e expressão heteróloga da elastase

Três genes de *A. hydrophila* envolvidos na produção de proteases extracelulares tem sido clonados e expressos. Um deles, clonado da linhagem SO2/2, codifica uma serino protease termo-lábil de 68 KDa (Cascón *et al.*, 2000b), muito semelhante à serino protease AspA produzida por *A. salmonicida* (Coleman & Whitby, 1993). Outro gene, que codifica uma metaloprotease termo-estável de 38 KDa foi clonado da mesma linhagem bacteriana (Rivero *et al.*, 1990), e um terceiro gene (*ahyB*), clonado da linhagem AG2, codifica uma metaloprotease responsável pela maior parte da atividade elastolítica evidenciada principalmente em isolados clínicos de *A. hydrophila* (Cascón *et al.*, 2000a).

No presente trabalho foi realizada a clonagem do gene da elastase da linhagem ambiental de *A. hydrophila* ATCC7966 sob controle do seu promotor e avaliação da expressão desta metaloprotease em *Escherichia coli* DH5α.

Para a clonagem do gene, foi construído um par de seqüências iniciadoras (item 4.9.1) com base na seqüência depositada no GeneBank. Estas seqüência iniciadoras foram desenhadas de tal forma a compreender a região controladora e o gene estrutural completo, conforme pode ser apreciado na seqüência correspondente a posição 912740-914913 do genoma de *A. hydrophila* ATCC7966 (CP00462).

```
TCCGCACCTCCCCTCCAGTCAGGGCCCGAAGCGGGCCGCCAAACCGCCAATGTAGCCAATCAACCCCTTGTACGCCA
AGGGTTTTCCATCTGTTCTTGCGCCCCGCCATCCCCATATGGAGGGGCGGTTGGTGGCAGCCAGAAAGCGCCTGGCC
ATTGTTTCGGCTTTTTTGGTGTATTTCGCCATTTTGAACCTCTCTCAGCTACCAAACAGGGGTAACAGCAGATCCTG
CTATGGGTTTGTGCTGCTCTGTACATATGACAGGCAGCAATCTTGAACGTGCCAACTAGTGTAGGAGCGCCGGGCA
ACGGACCCGACGTGTAATCTTCATCGACTTAAGGAAAAGACGGATGAACAAAGTCTATTTGGCCGTGGTATTGGCCT
GCTGGGGAAGCGCAGCGCTGGCTGCAGAACAGGTGGATGTGCATCAGGTAGCGGGCATTACAGGGGGCACCGAGCGG
CGCTGCCGGGGTGAGCGCGCTGGCAGGGGATGGCGAGTTTCGTAGGTGCGGGCGGTCAAGCTGCCCAACGGTCAG
CAGCGGGTACGCTATGAGCAGACCTGGCAGCGCATCCCGGTCTGGGGCCAGGTGCTGGTGGCCGAGCAGTCCCTCG
GCGGGCAGATAAGCCAGGTCTCTGGCCAGATCCTGCGCCAGATCGATGCCGACGTGGCCAGTCCGACCGCAGCCCT
GTCGCCGCGGATGCCGCCAGCAAGGCACGGGCTGGGGCCAGGGCAGCAACGAGCGGGTCAAGCTGTTTCGTGATG
CAGGATGAGGCGGGTCAGGCCCCGCTGGTCTATCTGGTCTCCTGGCTGGCGGCGAGCGACGAGCCGAGCCGCCCT
TCGTGGTGTATCGATGCCCAGAACGGCAGCGAGCTCAAGCGCTGGGAAGGGATCAACCACAAGGACGCCACCGGCC
GGGTGGCAACGTCAAGACCGGCAAGTATTTCTACGGTGGCGACTTCGGCCCCGTGCTGGTGGACGACAACCTGCCG
ATGACCAGCCCCGAACGTGGACACCCCTCAACATGAATCACGCCACCACGGGCGGCGCCATTCATCAGTTCACCTGCC
GGAGAACACGGTCAAGGAGATCAACGGCGCCTACTCGCCGCTCAACGACGCCCACTACTTCGGCAACGTGGTGTTCG
ACATGTACCGCAACTGGTACAACACGGCGCCGCTGACCTTCAAGTGAAGATGCGGGTGCACTACAGCCGCAACTAC
```

GAGAATGCCTTCTGGGACGGCAGCCAGATGACCTTCGGTGACGGCGCCACCACCTTCTACCCGCTGGTGAGCCTGGA
 CGTGGCGGCCCACGAGGTGAGCCACGGCTTTACCGAGCAGAACTCCGGGCTGGTCTACTCCGGTCAGTCGGGCGGC
 ATCAACGAGGCCTTCTCCGACATGGCGGGGAAGCGGCCGAGAACTTCATGAAGGGCAGCAACGACTGGCTGGTGG
 GCGCCAGATCTTCAAGGGCAACGGCTCGCTCGCTACTTCGAGGATCCGACCCGGGACGGCAGCTCCATCGGGCAT
 GCCAGCGACTACTACGATGGTATCGATGTGCACCACAGCTCCGGTGTCTACAACCGCGCCTTCTACCTGCTGGCCAA
 CACCAGCGGCTGGAACACCCGCAAGGCCTTTGAAGTGTTCTGTGCTGGCCAAACCGCCTCTACTGGGGTGCCAACACCA
 CCTTCGATCAGGGCGCCTGCGGGGTGACCAAGGCCGCGACCGATCTGGGCTACAGCGTGACCGACGTGGCGGGCGGC
 CTTTACCACTGTGGGGGTCAATGCCTCCTGCGGGCGGCACCACTCCGCAACCGGGCAGCGTGCTGCAAAACGGGGTAC
 CGGTGAGCGGTCTCTCCGCCGCCAAGGGTGGCAAGCTGAACCTTACCATCGACGTGCCGGCCGGCAAGAGCCAGCT
 GGTTATTGCCAGCAGCGGCGGTACCGGCGATGCGGATCTCTATGTGAAGTTCGGCAGCGTGCCGACCAGCAGCAGC
 TATGACTGCCGTCCCTACAAGAGCGGCAACGCCGAGACCTGCACCCTGAACTCGCCCAAGGCGGGGACCTGGAACG
 TGCAGCTGAGCGCCTACAGCGCCTTCTCGGGGGTGACCCTCAAGGCCAGCTACTGAGTCTGAGTCACCGTAATAGAG
 ATAGAGCGCCGGACTTGTCCGGCGCTTTTTT

Utilizando as seqüências iniciadoras desenhadas foi amplificado o segmento de 2086 pb que foi clonado no vetor pJET-PCR e a mistura de ligação utilizada para transformar a linhagem DH5 α de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados pelo crescimento e formação do halo de degradação de caseína em meio LB contendo ampicilina e leite desidratado. Dos transformantes obtidos, um foi selecionado (Elast7) com base na sua atividade proteolítica (Figura 12).

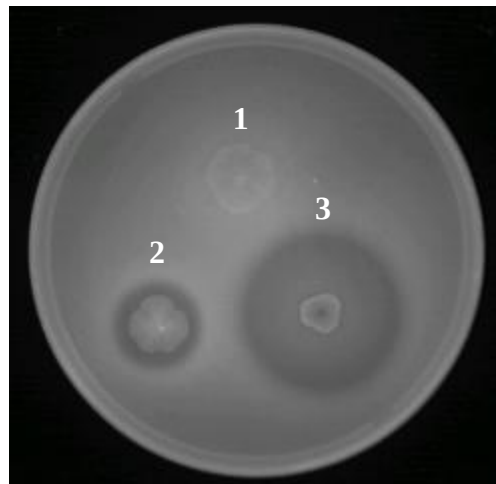


Figura 12. Atividade caseinolítica da linhagem *E. coli* DH5 α (1), transformante Elast7 (2) e *A. hydrophila* ATCC7966 (3) após 60h de crescimento a 37°C em meio LB+1% de leite desnatado (molico).

O transformante Elast7 apresentou um plasmídio com 5046pb correspondente ao vetor (2974pb) e o inserto (2086pb). Análise de restrição do plasmídio (Figura 13 A) permitiu verificar a posição anti-horária do inserto. O esquema do plasmídio quimérico (pJET-elastase) pode ser apreciado na Figura 13 B.

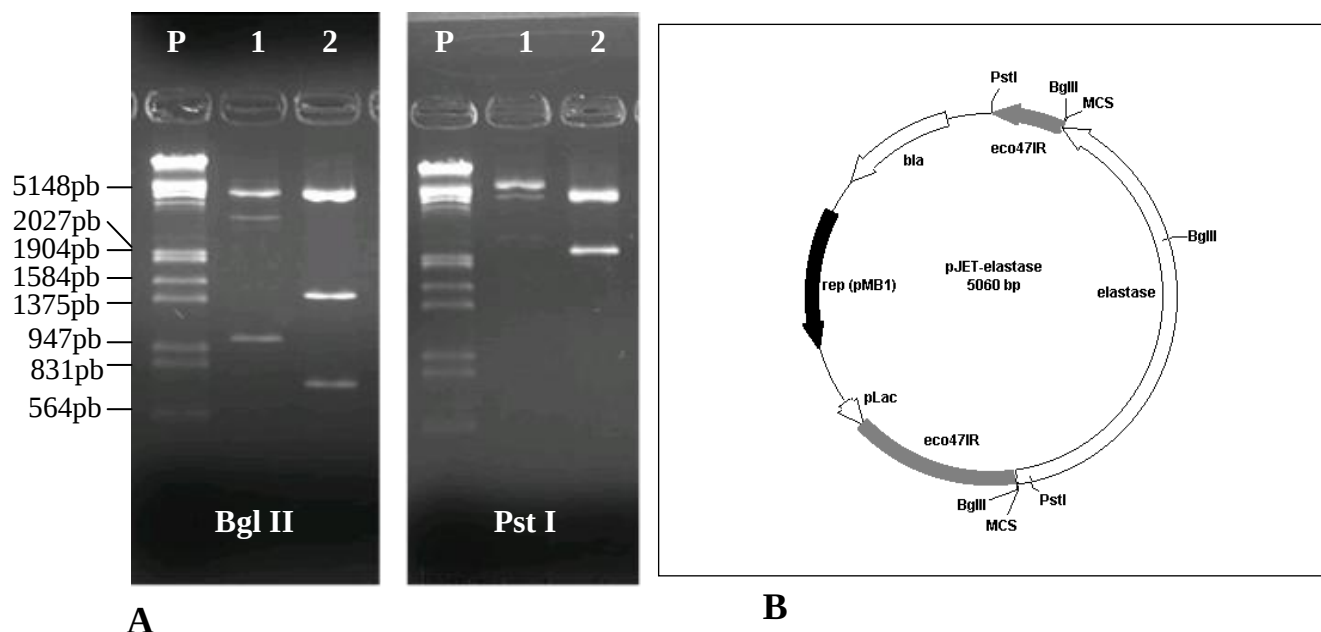


Figura 13. Análise de restrição (A) e mapa (B) do plasmídio quimérico pJET-elastase. P- Fago Lambda clivado com Hind III e EcoRI, 1- vetor pJET, 2- pJET-elastase.

Conforme pode ser observado na análise quali-quantitativa em placa (Figura 12), o transformante Elast7 apresenta atividade caseinolítica menor do que o parental *A. hydrophila*. Avaliação quantitativa da atividade caseinolítica e elastolítica do transformante e parentais (Tabela 8) permite evidenciar diferenças significativas em ambas as atividades. No caso da atividade caseinolítica esta diferença pode ser explicada pela alta atividade da serino protease de 56 KDa presente no parental ATCC7966 (IBAer 012) e de outras proteases do complexo

ausentes no transformante (itens 5.2 e 5.3). Já a diferença encontrada na atividade elastolítica pode estar associada a diferenças de expressão, maturação ou secreção da elastase entre o parental *A. hydrophila* e o transformante.

Tabela 8. Atividade caseinolítica e elastolítica dos parentais e transformante.

Linhasgens	Estatus	Atividade caseinolítica (U/ml) ^{*1}	Atividade elastolítica (U/ml) ^{**1}
DH5	Linagem receptora <i>E. coli</i>	2.29 ± 0,65 ^c	0,00 ± 0,00 ^c
ATCC7966	Linagem doadora <i>A. hydrophila</i>	56,81 ± 1,41 ^a	4,05 ± 0,25 ^a
Elast7	Transformante	35,94 ± 0,65 ^b	2,12 ± 0,42 ^b

- Atividades obtidas com extratos brutos após 48h de cultivo em meio LB+gelatina 1%.

* Atividade sobre azocaseína, ** Atividade sobre elastina Congo Red.

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

A análise de crescimento e atividade caseinolítica extracelular (Figura 14), permitiu verificar que a linhagem receptora DH5α apresenta apenas atividade caseinolítica residual durante o crescimento bacteriano, enquanto, a linhagem doadora ATCC7966 exibe um aumento da atividade caseinolítica extracelular a partir das 8 horas, meio da fase exponencial, atingindo atividade de 56,8 U/ml com 48 horas, após 32 horas na fase estacionária. Já o transformante Elast7 exibiu atividade proteolítica extracelular apenas a partir das 32 h de cultivo, no final da fase estacionária atingindo 35,94 U/ml nas 48 horas.

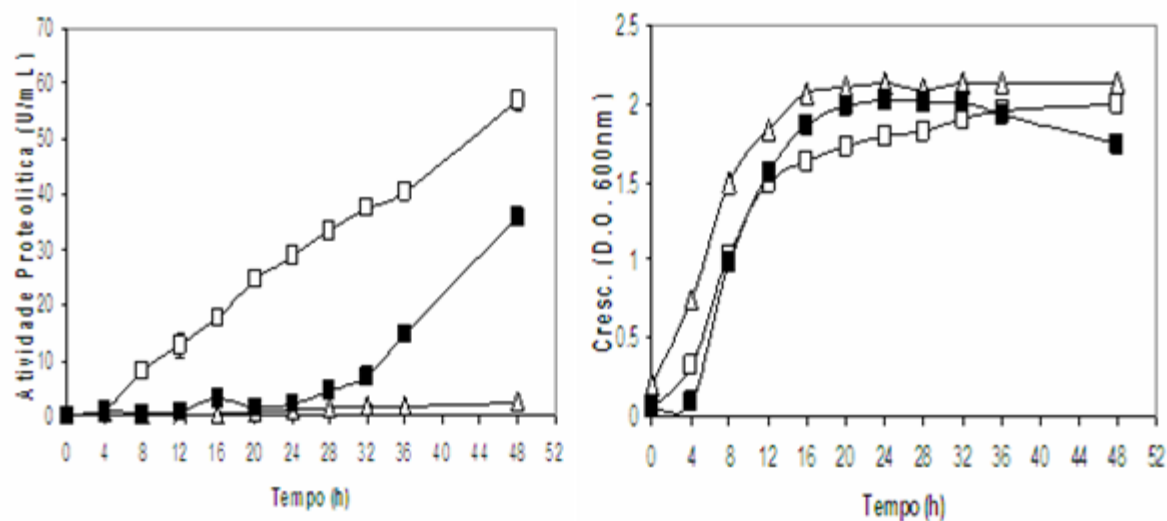


Figura 14. Curva de atividades caseinolíticas extracelulares (A) e crescimentos (B) das linhagens *A. hydrophila* ATCC7966 (□), *E. coli* DH5α (△) e o transformante Elast7 (■) em meio LB com 1% de gelatina.

A presença de atividade proteolítica extracelular apenas após 36 h durante a fase de declínio (Figura 14A e B) pode ser atribuída à ineficiência no processo de transporte da elastase através da membrana celular externa, sendo acumulada no espaço periplásmico e liberada durante a autólise bacteriana. Assim sendo, foi avaliada a atividade extracelular e periplasmática do transformante Elast7, *A. hydrophila* ATCC7966 e *E. coli* DH5α. Conforme mostram os dados da Tabela 9, o transformante apresenta atividade proteolítica periplasmática, não observada na linhagem DH5α e na doadora proteolítica ATCC7966.

Tabela 9. Atividade caseinolítica extracelular e periplasmática dos parentais e transformante.

Linhas	Descrição	Atividade caseinolítica extracelular (U/ml) ¹	Atividade caseinolítica periplasmática (U/10 ⁸ células) ¹
DH5α	Linhagem receptora <i>E. coli</i>	1,91 ± 0,11 ^c	0,03 ± 0,01 ^b
ATCC7966	Linhagem doadora <i>A. hydrophila</i>	40,56 ± 1,41 ^a	0,03 ± 0,05 ^b
Elast7	Transformante	14,91 ± 0,00 ^b	2,69 ± 0,17 ^a

- Atividades obtidas após 36h de cultivo em meio LB+gelatina 1%. Atividades sobre azocaseína.

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

Análise eletroforética de proteases extracelulares e periplasmáticas (Figura 15) permitiu verificar a presença de duas bandas correspondentes a proteases de 38 KDa e outra de 63KDa no extrato extracelular e no periplasma. Estas proteases são compatíveis com a elastase maturada e pro-elastase descritas por Cascón *et al.* (2000a).

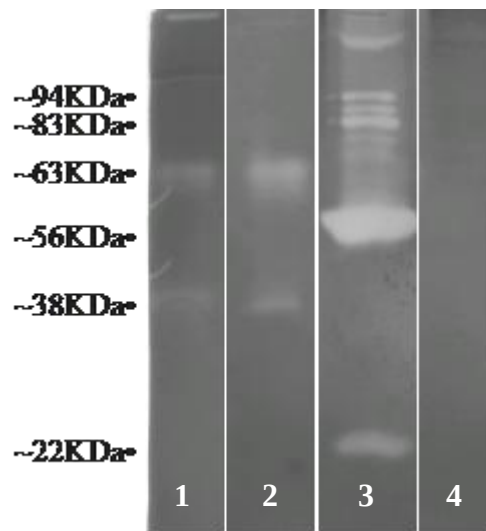


Figura 15. Perfil de proteases extracelulares (atividade gelatinolítica) do transformante: Elast7 - periplasma (1), Elast7 – extracelular (2), ATCC7966 – extracelular (3), DH5α – extracelular (4).

Segundo Cascón et al. (2000a), o gene elastase (*ahyB*) da linhagem AG2 de *A. hydrophila* codifica uma proteína de 588 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 62,73 KDa contendo um peptídio sinal de 19 aminoácidos e um propeptídio N-terminal de 164 aminoácidos, que quando retirados geram uma proteína intermediária de 405 aminoácidos (43,4 KDa), que é processada pela retirada de um pro-peptídio C-terminal resultando na elastase madura de 38 KDa. Dentro deste esquema de maturação, a protease de 63 KDa detectada em Elast7 poderia corresponder ao pré-propeptídio com a retirada de apenas o peptídio sinal.

A secreção de formas imaturas da elastase pode ser responsável, pelo menos em parte, pela baixa atividade proteolítica (caseinolítica e elastolítica) detectada no transformante Elast7. Por outro lado, a presença de elastase madura (38 KDa) no transformante apóia a hipótese de auto-maturação da elastase apontada por Cascón *et al.* (2000a).

Considerando a posição do inserto na construção pJET-elastase (Figura 13B), o gene da elastase de *A. hydrophila* ser controlado por “quorum sensing” (Cascón et al., 2000a) e o fato de *E. coli* não sintetizar homoserinolactonas (Gera & Srivastava, 2006), o gene da elastase poderia estar sendo expresso sob controle do promotor pLac. Este fato foi confirmado pela avaliação de atividade proteolítica em placas contendo IPTG (Figura 16). Na presença de IPTG halos correspondentes a atividade proteolítica da ordem de $1,8 \pm 0,1$ cm foram detectados após 48h de cultivo, momento no qual o halo foi apenas evidenciado em placas sem o indutor.

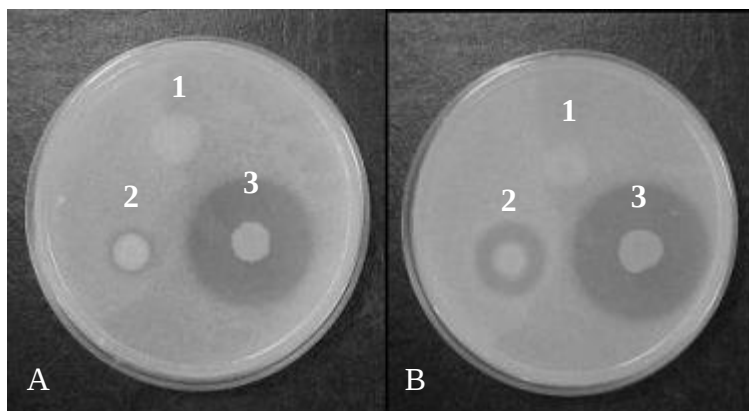


Figura 16- Indução da atividade proteolítica por IPTG no transformante Elast7. *E. coli* DH5 α (1), transformante Elast7 (2) e *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 (3). Sem IPTG (A) e com IPTG (B).

Este resultado é até certo ponto surpreendente considerando que entre o promotor pLac e o gene estrutural da elastase encontra-se um fragmento de 331 pb do gene *eco47IR* e uma sequência de 422 pb corresponde à região promotora do próprio gene *ahyB* de *A. hydrophila*. Por outro lado, esta região que precede o gene da elastase possui 753pb, deixando em “frame” o gene estrutural. Em estudos envolvendo a proteína de ligação à hemoglobina de *Helicobacter pylori*, Gonzáles-López & Olivares-Trejo (2009) observaram expressão em *E. coli* sob controle do promotor lac do vetor pJET1.2, mostrando que em determinadas construções este promotor pode controlar a expressão mesmo na presença do fragmento do gene *eco47IR*.

6. CONCLUSÕES

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

- 1- Bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam ampla variação intra e interespecífica na atividade caseinolítica extracelular. *Aeromonas hydrophila* apresenta maior atividade do que outras espécies do gênero, mas não foi constatada diferença significativa entre isolados clínicos e ambientais desta espécie.
- 2- A atividade caseinolítica extracelular em *A. hydrophila* IBAer109 é controlada pela densidade celular, fenômeno conhecido como “quorum sensing”. Além disto, estas enzimas são induzidas por gelatina e reprimidas por glicose, citrato e amônia.
- 3- As metaloproteases representam apenas 27,7% da atividade caseinolítica extracelular do isolado patogênico *A. hydrophila* IBAer 109.
- 4- As bactérias do gênero *Aeromonas* secretam um complexo proteolítico com atividade sobre gelatina formado por 2 a 5 proteases de massas moleculares distintas. Os perfis de gelatinases extracelulares variam dependendo do isolado e exibem uma tendência de padrão específico.
- 5- Zimogramas de proteases extracelulares utilizando caseína como substrato exibiram perfis com 0 a 4 bandas, com ampla variação quali-quantitativa entre isolados, a qual apresenta correlação com a atividade sobre azocaseína.
- 6- De um modo geral, as proteases de 94, 83, 66, 50, 48 e 29 kDa presentes em zimogramas de *Aeromonas* correspondem a metaloproteases, enquanto que a banda intensa de 56kDa foi caracterizada como uma serino protease. Além destas, algumas

proteases não foram inibidas por EDTA ou PMSF, representando outros grupos de proteases.

- 7- Isolados de *Aeromonas* apresentaram variação quanto ao perfil de bandas com atividade proteolítica sobre gelatina, caseína, ovoalbumina, soroalbumina bovina, colágeno, fibrinogênio, elastina e γ -globulina. Dentre as proteases extracelulares, a serino protease de 56 kDa e uma protease de 22 KDa exibiram atividades sobre a maior parte dos substratos.
- 8- O gene *ahyB* de *A. hydrophila* ATCC7966 foi clonado e expresso em *Escherichia coli* sob o controle do promotor lac.
- 9- A presença de proteases periplasmáticas e extracelulares de 63 e 38 kDa no transformante Elast7 indicam dificuldade de maturação e secreção da elastase através da membrana externa, por parte de *E. coli*.

7.REFERENCIAS 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.
- 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.
- Alanís, E.; Lara, P.; Guerrero, I. (1999) Proteolytic activity of four strains of *Pseudomonas* on crude extracts of contractile proteins. **Food Chem.** 67: 45-51.
- Alonso, J.L.; Botella, M.S.; Amoros, I.; Alonso, M.A. (1994). The occurrence of mesophilic aeromonads species in marine recreational waters of Valencia (Spain). **J. Environ. Sci. Health Part A Environ. Sci. Eng.** 29: 615-628.
- Altwegg, M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. (1999). In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology 7th, American Society for Microbiology.** 507–516.
- Arnadottir, H.; Hvanndal, L.; Andersdottir, V.; Burr, S.E.; Frey, J.; Gudmundsdottir, B.K. (2009). The AsaPI peptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp *achromogenes* is highly

- conserved deuterolysin metalloprotease (family M35) and a major virulence factor. **J. Bacteriol.** 109: 403-410.
- Barret, A.J. (1994). Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidase. **Meth. Enzymol.** 244: 1-15.
- Barret, A.J. (1995). Proteolytic Enzymes: aspartic and metallopeptidase. **Meth. Enzymol.**, 248: p.183.
- Barret, A.J.; Rawlings, N.D.; O'Brien, E.A. (2001). MEROPS database as a protease information system. **J. Struct. Biology**, 134: 95-102.
- Belas, R.; Wassif, C.; Cheek, D. (1995). Molecular analisys of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. **J. Bacteriol.** 20: 5790-5798.
- 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*. **Ciênn. Animal Bras.** 4: 69-83.
- Bizani, D. & Brandelli, A. (2001). Perfil de resistência/sensibilidade e virulência de espécies de *Aeromonas* isoladas de amostras de água obtidas em abatedouro de bovinos. **Braz. J. Microbiol.** 32:334-339.
- Bonato, M.C.M.; Costa. S.O.P.; Bianco, M. (1982). Instability of the protease (gelatinase) train in *Proteus mirabilis*. I study of newly isolated strains. **Rev. Microbiol.** 13:35-45.
- Borrel, N.; Acinas, S.G.; Figueiras, M.; Martinez-Murcia, A.J. (1997). Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1671-1674.
- Brenner, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a table of two serines. **Nature** 334: 528-530.

- Buchanan, R.L. & Palumbo, S.A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Safety**. 7: 15-29.
- Bulhões, C.C.C.; Rossi Junior, O.D. (2002). Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 54: 320-324.
- Burke, V.; Robinson, J.; Gracey, M.; Peterson, D.; Partridge, K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. **Appl. Environ. Microbiol**. 48: 361-366.
- Carnahan, A.M. & Altwegg, M. (1996). Taxonomy. In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed) **The Genus Aeromonas**. John Wiley & Sons, New York, NY. P 1 – 38.
- Cascón, A.; Jugueros, J.; Temprano, A.; Sánchez, M.; Hernanz, C.; Lunego, M. J.; Naharro, G. A. (2000a). A Major Secreted Elastase is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophilla*. **Infect. Immun**. 68: 3233-2341.
- Cascón, A.; Fregeneda, J.; Aller, M.; Yugueros, J.; Temprano, A. Hernanz, C.; Sánchez, M.; Rodriguez-Aparicio, L.; Naharro, G. (2000b). Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*. **J. Fish Dis**. 23: 1-11.
- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M.J.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Rernández-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. **Int. J. Food Microbiol**. 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. J. Microbiol. Serol.** 84: 269-278.
- Chang, T. M., Liu, C. C., Chang, M. C. (1997). Cloning and sequence analysis of the gene (*eprA1*) encoding an extracellular protease from *Aeromonas hydrophila*. **Gene.** 199: 225-229.
- Cho, S.; Park, J.; Park, S.J.; Lim, J.; Kim, E.H.; Cho, Y.; Shin, K. (2003) Purification and characterization of extracellular temperature-stable serine protease from *Aeromonas hydrophila*. **The J. Microbiol.** 41: 207-211.
- Coleman, G. & Whitby, P.W. (1993). A comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* with those of other subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites. **J. Gen. Microbiol.** 139: 245-249.
- Colwell, R.R. & Macdonell, M.T. (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36: 473-477.
- Costa, F.N. & Rossi Júnior, O.D. (2002) Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 54: 534-535.
- 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.
- 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.
- Ellis, A.E.; Hastings, T.S.; Munro, A.L.S. (1981). The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. **J. Fish Dis.** 4:41-51.

- Ellis, A.E. & Stapleton, K.J. (1988). Differential susceptibility of salmonid fishes to furunculosis correlates with differential serum enhancement of *Aeromonas salmonicida* extracellular protease activity. **Microb. Pathog.** 4: 299-304.
- Erova, T.E.; Pillai, L.; Fadl, A.A.; Sha, J.; Wang, S.; Galindo, C.L.; Chopra, A.K. (2006), DNA adenine methyltransferase influences the virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.** 74: 410-424.
- Esteve C. & Birkbeck T.H. (2004). Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (Elastase). **J. Appl. Microbiol.** 96: 994-1001.
- 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.
- Figueras, M.J. (2005). Clinical relevance of *Aeromonas*. **Rev Med Microbiol.** 16:145-153.
- 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.
- Garrit, G.M.; Winters M.; Searles D.B.; (2001). Taxonomic outline of the prokaryotic genera Bergey's manual of systematic bacteriology [document on line]. Bergey's manual trust. 2nd ed. Version 4.01. New York: Spriners-Verlag; Available from <URL: <http://www.cme.msu/bergeys/april/2001-genus.pdf> (20 de abril).
- Gera, C. & Srivastava, S. (2006) Quorum sensing: the phenomenon of microbial communication. **Curr. Sci.** 90: 666-676.

- Goldfrey, T. & West, S. (1996). **Industry enzymology**, 2nd ed. Macmillian Publishers, New York.; p.3.
- González-López, M.A. & Olivares-Trejo, J.J. (2009) The gene *frpB2* of *Helicobacter pylori* encodes an hemoglobin-binding protein involved in iron acquisition. **Biometals** (DOI 10.1007/s 10534-009-9240-5).
- Han, H.; Taki, T.; Kondo, H.; Hirono, I.; Aoki, T. (2008). Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*. **Can. J. Microbiol.** 54(1): 1-10.
- Hande, H.S.; Shobha, K.L.; Thunga, R.K.; Anand, K.M. (2006). Detection of *Aeromonas* in water samples in and around manipal: a preliminary study. **Ind. Jour. Pract. Doctor.** 3:4.
- Handfield, M.; Simard, P.; Couillard, M.; Letarte, R. (1996). *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). **Appl. Environ. 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. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54:481-485.
- Häse, C. C. & Finkelstein, R. A. (1993). Bacterial extracellular zinc-containing metalloprotease. **Microbiol. Rev.** 57:823-837.
- Hazen, T.C.; Flierman, C.B.; Hirsch, R.P.; Esch, G.W. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. **Appl. Environ. Microbiol.** 36:731-738.

- Holmes, P. & Niccolls L.M. (1995). Aeromonads in drinking water supplies their occurrence and significance. **J. Chartered Inst. Water Environ. Manag.** 9: 464-469.
- 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.
- Huys, G.; Kämpfer, P.; Albert, M.J.; Kühn, I.; Denys, R.; Swings, J. (2002). *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stamer 1943 (Approved Lists 1980). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 705-712.
- Huys, G., Pearson, M.; Kämpfer, P.; Denys, R.; Cnockaert, M.; Inglis, V.; Swings, J. (2003). *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 885–891.
- International Union of Biochemistry. (1992). **Enzyme nomenclature**. Academic Press, Inc. Orlando, Fla.
- 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 Microbiol.** 7: 1-11.
- Joseph, S.W. & Carnahan, A.M. (2000). Update on the Genus *Aeromonas*. **ASM News.** 66:218-221.

- Kobayashi, H.; Takahashi, E.; Oguma, K.; Fujii, T.; Okamoto, K. (2006). Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the Kexin family of subtilases. **FEMS Microbiol. Lett.** 256: 165-170.
- 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, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Leung, K.Y. & Stevenson, R.M. (1988). Characteristics and distribution of extracellular protease from *Aeromonas hydrophila*. **J. Gen. Microbiol.** 134:151-160.
- Litchfield, C.D. & Prescott, J.M. (1970). Regulation of proteolytic enzyme production of *Aeromonas proteolytica*. I. Extracellular endopeptidase. **Can. J. Microbiol.** 16: 17-22.
- Loewy, A. G.; Santer, U. V.; Wieczorek, M.; Blodgett J. K.; Jones, S. W. Cheronis, J. C. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase of *Aeromonas hydrophila*. **J. Biol. Chem.** 268: 9071-9078.
- 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.
- Martinez-Murcia, A.J.; Saavedra, M.J.; Mota, V.R.; Maier, T.; Stackebrandt, E.; Cousin, S. (2008). *Aeromonas aquarium* sp. nov. isolated from aquaria ornamental fish. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 1169-1175.
- Martins, L.M.; Marquez, R.F.; Yano, T. (2002). Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food in human infection. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** 32: 237-242.

- Mateos, D.; Anguita, J.; Naharro, G.; Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. **J. Appl. Bacteriol.** 74: 111-118.
- Merkel, J.R.; Traganza, E.D.; Mukherjee, B.B.; Griffin, T.B.; Prescott, J.M. (1964). Proteolytic activity and general characteristics of a marine bacterium, *aeromonas proteolítica* sp. **J. Bacteriol.** 87: 1227-1233.
- Michelim, L.; Lahude, M.; Araújo, P.R.; Giovanaz, D.S.H.; Muller, G.; Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Echeverrigaray, S. (2005). Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Braz. J. Microbiol.** 36: 17-23.
- Miñana-Galbís, D. (2002). Biochemical Identification and Numerical Taxonomy of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Clinical Samples in Spain. **J. Appl. Microbiol.** 93: 420-430.
- Miñana-Galbís, 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.
- Miñana-Galbís, D.; Farfán, M.; Fusté, M.C.; Lorén, G. (2007). *Aeromonas bivalvium* sp. nov. Isolated from bivalve molluscs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 582-587.
- Miyoshi, S. & Shinoda, S. (2000). Microbial metalloprotease e pathogenesis. **Microb. Infection.** 2: 91-98.
- Montfort, P. & Baleux, B. (1991). Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp in brackish water receiving sewage treatment effluent. **Appl. Environ. Microbiol.** 9: 2459-2467.

- Nakasone, N.; Toma, C.; Song, T.; Iwanaga, M. (2004). Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 237: 127-132.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Revisado em: abr 2007. Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.
- Neves, M.S.; Nunes, M.P.; Ricciardi, I.D. (1990). Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Protec.** 53: 78-80.
- Neru, H.C. & Hepell, L.A. (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. **J. Biol. Chem.** 240: 3685-3692.
- Nieto, T. P. & Ellis A. E. (1986). Characterization of extracellular metallo- and serine-protease of *Aeromonas hydrophila* strain B51. **J. Gen. Microbiol.** 132:1975-9.
- Nishimura, A.; Morita, A.; Nishimura, Y.; Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucl. Acids Res.** 18:6169.
- Nitta, H.; Kobayashi, H.; Irie, A.; Baba, H.; Okamoto, K.; Imamura, T. activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. **FEBS Lett.** 581: 5935-5939.
- Oldak, E. & Trafny, E. (2005). Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin Antimicrob. **Agents Chemother.** 49:3281–3288.
- Okamoto, k.; Nomura, T.; Hamada, M.; Fukuda, T.; Noguchi, Y.; Fujii, Y. (2000). Production of serine portease of *Aeromonas sobria* is controlled by the protein encoded by the gene lying adjacent to 3' and the protease gene. **Microbiol. Immunol.** 9: 787-798.

- O'Reilly, T. & Day, D.F. (1983). Effects of culture conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 45:1132-1135.
- Pailin, T.; Kang, D.H.; Schmidt, K.; Fung, D.Y.C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-production lactic acid bacteria culture on skim milk agar. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 45-49.
- Pereira, C.S.; Possas, C.A.; Viana, C.M.; Rodrigues, D.P. (2004). *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (Perna perna) In Natura e Pré-Cozidas no Rio de Janeiro. **Ciênc. Technol. Aliment.** 24: 562-566.
- Pidiyar, V.; Kasnowski, A.; Narayan, N.B.; Shouche, Y.S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 32: 1723-1728.
- Ponmurugan, P. (2007). Proteolytic activity of *Bacillus cereus* under in vitro condition. **J. Biol. Science.** 7: 65-67.
- Popoff, M. & Lallier, R. (1984). Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. **Meth. Microbiol.** 16: 127 - 145.
- Rao M.B.; Tanksale, Q.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 597-635.
- Razer, K.J.; Posner, A.; Wang, K.K.W. (1995). Casein zymography: a method to study m-calpain, and their inhibitory agents. **Arch. Biochem. Biophys.** 319: 211-216.
- Rawling N.D. & Barrte A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.** 290: 205-218.

- Riddle, L.; Graham, E.T.; Ambroski, L.R. (1981). Medium for accumulation of extracellular hemolysins and protease by *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immunity**. 9: 728-733.
- Rivero, O.; Anguita, J.; Paniagua, C.; Naharro, G. (1990). Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. **J. Bacteriol.** 172: 3905-3908.
- Rodríguez, L.A.; Ellis, A.E.; Nieto, T.P. (1992). Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B23: all are lethal for fish. **Microb. Pathog.** 13:17-24.
- Rossi Júnior, O.D.; Amaral, L.A.; Nader Filho, A. (2000). Bactérias do Gênero *Aeromonas* em Água de Matadouro Bovino. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** doi: 10.1590/S0102-09352000000500023.
- 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.
- Saha, T.; Chakrabati, T. (2006). *Aeromonas sharmana* sp. Nov., isolated from a warm spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 1905-1909.
- Sakai, D. K. (1985). The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products. **J. Fish Dis.** 7:329-338.

- Santos, J.A.; Gonzáles, C.J.; López-Dias, T.M.; García-López, M.L.; Otero, A. (1996). Extracellular protease production by dairy strains of *Aeromonas hydrophila* as affected by grow media and incubation temperature. **Food Microbiol.** 13: 47-51.
- Shannon, J.D.; Baramova, E.N.; Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. (1989). Amino acid sequence of *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. **J. Biol. Chem.** 264: 11575-11583.
- Shieh, H. S. (1982). Lethal toxicity of *Aeromonas salmonicida* protease to Atlantic salmon. **Microbios Lett.** 11:73-76.
- 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.
- Song, T.; Toma, C.; Nakasone, N.; Iwanaga, M. (2004). Aerolisin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria. **J. Med. Microbiol.** 53: 477-482.
- 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.
- Tequianes-Bravo, L.; Pérez-Gonzálvez, D.A.; Gonzálvez-Malváez, M.M.; Flores-Pimentel, M.; Marroquín-Segura, R. (2005). Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores

Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.
Bioquímica (México).30: 23-29.

Toma, C.; Ichinose, Y.; Iawnaga, M. (1999). Purification and characterization of an *Aeromonas caviae* metalloprotease that is related to the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease. **FEMS Microbiol. Lett.** 170: 237-242.

USEPA. (2005). Drinking water contaminant candidate list. Federal Register, February 24, 2005. Volume 70, Number 36: 9071-9077. Available from [http: www.epa.gov./fedrgstr/epa-water/2005/February/day 24/w3527.htm (24 de fevereiro)].

Van der Kooj, D. (1988). Properties of aeromonads and their occurrence and hygienic significance in drinking water. **Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. B.** 187: 1–17.

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 Lípase Substrate-Binding Domain and Genotyping of *Aeromonas hydrophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 145-151.

Wassif, C; Cheek, D.; Belas, R. (1995). Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. **J. Bacteriol.** 177: 5790-5798.

Whitby, P.W.; Landon, M.; Coleman, G. (1992). The cloning and nucleotide sequence of the serine protease (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. **FEMES Microbiol. Lett.** 99: 65-72.

Wiersma, M.; Hansen, A.; Harder, W. (1978). Effect of environmental conditions on the production of two extracellular proteolytic enzyme by *Vibrio* SAI. **Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.** 44: 129-140.

- 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.
- 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.
- Zucolotto, T.; Delamare, A.P.L.; Costa, S.O.P.; Echeverrigaray, S. (2006). *Aeromonas* Growth Under Low Temperatures. In: A. Mendez-Vilas. (Org.) **Modern Multidisciplinary Appl. Microbiol.: Exploiting Microbes and Their Interations.** Weinheim: Willey-VCH. p. 276-280.