

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JEAN CARLOS MACHADO DA COSTA

**RNAs não codificadores regulatórios em bactérias do
gênero *Aeromonas***

CURITIBA

2017

JEAN CARLOS MACHADO DA COSTA

RNAs NÃO CODIFICADORES REGULATÓRIOS EM BACTÉRIAS DO GÊNERO
Aeromonas

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioinformática, no Curso de Pós-Graduação em Bioinformática, Setor de Educação Profissional e Tecnológica, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Prof^ª. Dra. Maria Berenice R. Steffens

Co-Orientadores:
Prof. Dr. Alexandre Rossi Paschoal
Prof^ª Dra Cyntia Maria T. Fadel-Picheth

CURITIBA
2017

C837 Costa, Jean Carlos Machado da
RNAs não codificadores regulatórios em bactérias do gênero - Aeromonas/Jean
Carlos Machado da Costa. -- Curitiba, 2017.
77 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Maria Berenice R. Steffens.
Co-Orientadores: Prof. Dr. Alexandre Rossi Paschoal e Cyntia Maria T. Fadel-
Picheth
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Educação
Profissional e Tecnológica. Programa de Pós-Graduação em Bioinformática.

Inclui Referências.

1. Aeromonas. 2. RNA não codificador. 3. Bactérias. 4. Virulência (Microbiologia). I.
Steffens, Maria Berenice R. II. Paschoal, Alexandre Rossi. III. Fadel-Picheth, Cyntia Maria
T. IV. Título. V. Universidade Federal do Paraná.

CDD 616.014

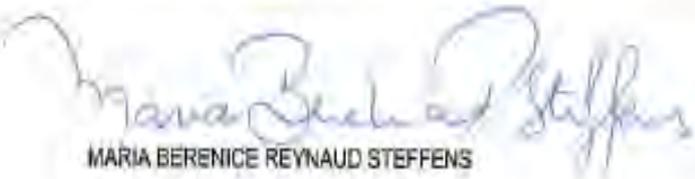


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
Programa de Pós-Graduação BIOINFORMÁTICA

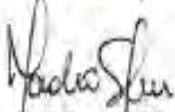
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOINFORMÁTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JEAN CARLOS MACHADO DA COSTA** intitulada: **RNAs não codificadores regulatórios em bactérias do gênero *Aeromonas***, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO

Curitiba, 18 de Abril de 2017.


MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


RAFAEL MAZER ETTO
Avaliador Externo (UEPG)


MICHELLE ZIBETTI TADRA SFEIR
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho, em outras palavras essa grande conquista, a Deus, aos meus pais, a toda minha família, as pessoas que eu amo e que são de extrema importância em minha vida, aos meus amigos e as pessoas que depositaram a confiança delas na minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu coragem para enfrentar o desconhecido, força e ânimo para suportar as tempestades e garra para lutar até o fim.

Agradeço à minha família. A carreira que quis seguir é resultante da boa educação que sempre tive e dos bons exemplos de profissionais que eles significam para mim.

A minha orientadora Professora Maria Berenice R. Steffens, que me ensinou a disciplina e a amadurecer profissionalmente. Aos meus co-Orientadores pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

Meus sinceros agradecimentos a todos que me ensinaram muito mais do que teoria, mas por me ouvir e sempre ter um conselho sereno para dar, por estarem sempre à disposição mesmo quando atarefados. E também por me darem o exemplo humano de ser professor e pesquisador.

A todos os professores e amigos do Programa de Pós-graduação em Bioinformática que me ajudaram ou simplesmente me ouviram. A secretária do programa por desempenhar o seu excelente trabalho e dar suporte aos discentes do programa. Levarei essas boas lembranças para sempre comigo.

As agencias de fomento CAPES e CNPQ.

*“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas
e insensatas. Perdoe-as assim mesmo!
Se você é gentil, podem acusá-lo de egoísta,
interesseiro. Seja gentil assim mesmo!
Se você é um vencedor terá alguns falsos amigos e
alguns inimigos verdadeiros. Vença assim mesmo!
Se você é bondoso e franco poderão enganá-lo.
Seja bondoso e franco assim mesmo!
O que você levou anos para construir, alguém pode
destruir de uma hora para a outra.
Construa assim mesmo!
Se você tem paz e é feliz, poderão sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo! O bem que você faz hoje,
poderão esquecê-lo amanhã.
Faça o bem assim mesmo!
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode
nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo!
Veja você que, no final das contas é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e os outros!”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Bactérias do gênero *Aeromonas* são Gram-negativas com forma de bastonetes e que não formam esporos. São anaeróbias facultativas e quimiorganotróficas. Desde 1992 formam a nova família Aeromonadaceae, ordem Aeromonadales, classe Proteobacteria e subclasse gammaProteobacteria. São ubíquas de ambientes aquáticos e apresentam alto grau de patogenicidade, causando infecções oportunistas. Produzem fatores de virulência que constituem foco do interesse clínico. Em bactérias, os RNAs não codificantes com função regulatória (ncRNAs) podem modular respostas fisiológicas, principalmente através da interação ncRNA-mRNA. A predição de ncRNAs em bactérias do gênero *Aeromonas* pode ampliar o conhecimento sobre a regulação dos mecanismos de patogenicidade. Neste trabalho utilizamos a abordagem bioinformática para obter sequências candidatas a ncRNAs e seus prováveis alvos nas espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota* e *A. veronii*. Para isso foram utilizadas as ferramentas Infernal versão 1.1.1. (*inference of RNA alignments*) e TargetRNA2, respectivamente. Segundo o banco de famílias de RNA Rfam, dentre os 231 candidatos preditos, 50 deles foram classificados como ncRNAs com propriedades regulatória. Foram também encontrados 175 RNAs curtos (*smallRNAs*) e 6 *riboswitches*. Identificamos ncRNAs reguladores que atuam *in cis* e ncRNAs que atuam *in trans*, sendo estes últimos frequentemente dependentes da proteína Hfq, uma chaperona de RNA. Dentre os eventos regulados estão virulência, formação de biofilmes e sobrevivência celular. Em *A. veronii* bv *sobria* 312M, a expressão de alguns ncRNAs foi confirmada por sequenciamento de RNA (RNA-Seq) extraído de células cultivadas na presença ou ausência de desoxicolato de sódio, que mimetiza a exposição da bactéria a um sal biliar secundário. Foi verificado o aumento da expressão do RNA curto 6S (200%) e a diminuição da expressão dos ncRNAs CsrB1(81%), CsrB2 (56%) e PrrB_RsmZ (23%). O 6S RNA é comumente expresso na fase estacionária e regula a atividade da holoenzima RNA Polimerase. Os ncCsrB fazem parte do sistema regulatório CsrA/CsrB que tem um efeito regulador negativo sobre a síntese de glicogênio, gliconeogênese e catabolismo de glicogênio e um efeito regulador positivo na glicólise. E, aparentemente, o ncPrrB_RsmZ poderia formar um complexo regulatório ncPrrB_RsmZ/mRNACsrA. Também foi investigada a existência de ilhas genômicas em *A. veronii* B565. Foram empregados as ferramentas GIPSy, ZIsland e IslandView. Destaca-se a presença do gene *nudF*, que é alvo do ncRNA CsrB, em uma das ilhas genômicas preditas pelo ZIsland. A proteína NudF está envolvida na regulação da síntese do glicogênio. Utilizando o IslandView foi possível visualizar os genes *lysR*, *CheW*, *bvgS* que também são alvos de ncRNAs. Finalmente, os resultados alcançados apontam uma nova linha de investigação para a compreensão do metabolismo e da patogenicidade de *Aeromonas* spp.

Palavras-chave: *Aeromonas*, RNA não codificador, virulência, bactérias.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Aeromonas* are gram-negative rod-shaped and do not form spores. They are facultative anaerobes and chemorganotrophic. Since 1992 they form the new family *Aeromonadaceae*, order *Aeromonadales*, class Proteobacteria and subclass gamma-Proteobacteria. They are ubiquitous in aquatic environments and present a high degree of pathogenicity, causing opportunistic infections. Produce virulence factors are the focus of clinical interest. In bacteria, non-coding RNAs with regulatory function (ncRNAs) may modulate physiological responses, primarily through the ncRNA-mRNA interaction. The prediction of ncRNAs in bacteria of the genus *Aeromonas* can increase the knowledge about the regulation of pathogenicity mechanisms. In this work we used the bioinformatic approach to obtain candidate sequences for ncRNAs and their probable targets in the species *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota* and *A. veronii*. For this, the Infernal 1.1.1 tools were used. (Inference of RNA alignments) and TargetRNA2, respectively. According to the RNA Rfam family bank, among the 231 candidates predicted, 50 of them were classified as ncRNAs with regulatory properties. There were also 175 small RNAs and 6 riboswitches. We identified regulatory ncRNAs that act in cis and ncRNAs that act in trans, the latter often being dependent on the Hfq protein, an RNA chaperone. Among the regulated events are virulence, formation of biofilms and cell survival. In *A. veronii* bv *sobria* 312M, the expression of some ncRNAs was confirmed by RNA sequencing (RNA seq) extracted from cells cultured in the presence or absence of sodium deoxycholate, which mimics the exposure of the bacterium to a secondary bile salt. Were observed increased expression of small 6S RNA (200%) and decreased expression of ncRNAs CsrB1 (81%), CsrB2 (56%) and PrrB_RsmZ (23%). 6S RNA is commonly expressed in the stationary phase and regulates the activity of the holoenzyme RNA polymerase. The ncCsrB make the regulatory system CsrA/CsrB that has a negative regulatory effect on glycogen synthesis, gluconeogenesis and glycogen catabolism and a positive regulatory effect on glycolysis. And, apparently, ncPrrB_RsmZ could form a regulatory complex ncPrrB_RsmZ/mRNACsrA. We also investigated the existence of genomic islands in *A. veronii* B565. The GIPSy, ZIsland and IslandView tools were used. We highlight the presence of the *nudF* gene, which is the target of ncRNA CsrB, in one of the genomic islands predicted by ZIsland. The NudF protein is involved in the regulation of glycogen synthesis. Using IslandView it was possible to visualize the *lysR*, *CheW*, *bvgS* genes that are also targets of ncRNAs. Finally, the results show a new line of research to understand the metabolism and pathogenicity of *Aeromonas* spp.

Key-words: *Aeromonas*, non-coding RNA, virulence, bacterium.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PAREAMENTO DE UM <i>CIS-ENCODED</i> ncRNA COM O SEU ALVO...	20
FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DE UM <i>TRANS-ENCODED</i> ncRNA EM RELAÇÃO AO ALVO E SEU MODO DE AÇÃO.....	21
FIGURA 3 - DETALHE DO PAREAMENTO DE UM <i>TRANS-ENCODED</i> ncRNA COM SEU ALVO	21
FIGURA 4 - <i>RIBOSWITCH</i>	22
FIGURA 5 – SISTEMAS DE SECREÇÃO BACTERIANOS	30
FIGURA 6 - ncRNAs PREDITOS EM <i>Aeromonas</i> spp.....	38
FIGURA 7 - GENOMA CIRCULAR DE <i>A. veronii</i> B565, MOSTRANDO PROVÁVEIS REGIÕES DE ILHAS GENÔMICAS.....	46
FIGURA 8 - ILHAS GENÔMICAS PREDITAS PELA FERRAMENTA ZISLAND EM <i>A. veronii</i> B565	47
FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>nudF</i> EM ILHA GENÔMICA PREDITA EM <i>A. veronii</i> B565	48
FIGURA 10 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO ncRNA 6S de <i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> e de <i>E. coli</i>	49
FIGURA 11 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO ncRNA CsrB DE <i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> e <i>E. coli</i>	50
FIGURA 12 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS ncRNAs CsrB1 e CsrB2 de <i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> e CsrB de <i>E. coli</i>	50
FIGURA 13 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS ncRNAs EM <i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> 312M	51

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESPÉCIES ATUALMENTE INCLUÍDAS NO GÊNERO <i>Aeromonas</i> . ..	17
QUADRO 2- CLASSE DE RNAs E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES	18
QUADRO 3 - LISTA DE ncRNAs REGULATÓRIOS ENCONTRADOS EM CADA ESPÉCIE DE <i>Aeromonas</i> spp.....	39
QUADRO 4 - ncRNAs REGULATÓRIOS DE <i>Aeromonas</i> spp. E SEUS POSSÍVEIS ALVOS PREDIOS PELA FERRAMENTA TargetRNA2.....	41
QUADRO 5 - ALVOS DOS ncRNAs E SUAS CARACTERÍSTICAS	42
QUADRO 6 - ncRNAs REGULATÓRIOS DE <i>Aeromonas</i> spp. E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO.....	43
QUADRO 7 – FATORES DE VIRULÊNCIA ALVOS DE ncRNAs EM <i>Aeromonas</i> spp. E SEUS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA	44
QUADRO 8 - PREDIÇÃO DE ILHAS GENÔMICAS EM <i>A. veronii</i> B565 – FERRAMENTA GIPSy	45

LISTA DE ABREVIATURAS

bv	-	Biovar
cDNA	-	DNA complementar
CM	-	Modelo de covariância
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
miRNA	-	Micro RNA
mRNA	-	RNA mensageiro
ncRNA	-	RNA não codificador
PAI's	-	Ilhas de patogenicidade
pb	-	Pares de base
RBS	-	Sítio de ligação do ribossomo
Rfam	-	Banco de dados de família de RNAs
RNA	-	Ácido ribonucléico
rRNA	-	RNA ribossomal
siRNA	-	Pequeno RNA de interferência
sRNA	-	Small RNA
tRNA	-	RNA transportador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Aeromonas</i> spp.	14
2.2 RNAs NÃO CODIFICADORES	17
2.3 PREDIÇÃO E VALIDAÇÃO DE ncRNAs	23
2.3.1 PREDIÇÃO DE RNAs NÃO CODIFICADORES	24
2.3.2 VALIDAÇÃO DE RNAs NÃO CODIFICADORES	25
2.3.3 PREDIÇÃO DE ALVOS DE RNAs NÃO CODIFICADORES	26
2.4. ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS ncRNAs BACTERIANOS	27
2.5 SISTEMAS DE SECREÇÃO EM BACTÉRIAS	29
2.6 ILHAS DE PATOGENICIDADE EM PROCARIOTOS	30
2.6.1 PREDIÇÃO DE ILHAS DE PATOGENICIDADE EM PROCARIOTOS ..	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Aeromonas spp. são bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas e que não formam esporos. Compõem a microbiota autóctone de ecossistemas aquáticos, mas estão amplamente disseminadas pela natureza, e são mais frequentemente isoladas no verão. Algumas espécies são patogênicas para humanos e as infecções decorrem principalmente da ingestão de água ou alimentos contaminados, e contato com água contaminada, causando infecções locais, intestinais, ou sistêmicas. *Aeromonas* spp. foi identificada como o agente responsável por 90% das infecções de pele e tecidos adjacentes observadas após desastres ambientais na Tailândia e Estados Unidos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, *Aeromonas* spp. é um dos importantes agentes de infecções gastrointestinais, que tem a diarreia como principal manifestação. Estas infecções estão associadas ao alto índice de mortalidade infantil no mundo.

O objetivo deste trabalho foi prever RNAs não codificadores (ncRNAs) e seus alvos em bactérias do gênero *Aeromonas*, por meio de abordagens de bioinformática. Foram utilizadas as ferramentas preditoras Infernal versão 1.1.1 (para ncRNAs) e TargetRNA2 (para ncRNAs/alvos). A expressão de alguns preditos foi observada em sequenciamento de RNA obtido de *Aeromonas veronii* bv *sobria* 312M cultivada em meio BHI adicionado de desoxicolato de sódio, um composto presente na bile. A anotação das sequências e a sugestão de função dos ncRNAs preditos foi obtida na base de dados Rfam 12.1, que contém uma coleção de famílias de ncRNA. Foi investigada a presença de alvos relacionados com virulência e alvos presentes em ilhas genômicas. Através destas análises pretende-se contribuir para o entendimento do papel dos ncRNAs na regulação dos mecanismos fisiológicos da bactéria, incluindo os mecanismos de virulência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aeromonas* spp.

Bactérias do gênero *Aeromonas* são bacilos Gram-negativos que não formam esporos (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2005). São quimiorganotróficas; anaeróbias facultativas que realizam metabolismo oxidativo e fermentativo da D-glicose; expressam as enzimas citocromo-oxidase e catalase e realizam a redução de nitrato a nitrito. As condições ótimas de temperatura compreendem 22 a 37 graus célsius e o pH varia entre 5,5 a 9,0 (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2005).

Os primeiros isolados de *Aeromonas* spp. datam o final do século XIX, mas só em 1936 o gênero foi proposto por Kluysen e Van Niel e, inicialmente, foi incluído na família Pseudomonadaceae (SCHUBERT, 1967). Em 1974 o gênero foi incluído na família Vibrionaceae. Porém, estudos de hibridização rRNA-DNA dos membros desta família indicaram que havia bactérias com diferenças suficientes para criar uma nova família. Estudos subsequentes, realizados por Colwell e colaboradores em 1986, e confirmados em 1992 por Martínez-Murcia e colaboradores, através de um estudo filogenético baseado na análise da sequência do gene rRNA 16S, verificaram que esses microrganismos são evolutivamente diferentes do gênero *Vibrio*, o que levou a descrição da família Aeromonadaceae, ordem Aeromonadales, classe Proteobactéria e subclasse GammaProteobacteria (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2005).

Aeromonas spp. faz parte da microbiota de ecossistemas aquáticos, estão amplamente disseminados na natureza (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2005; PALU *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2007, FIGUEIRA *et al.*, 2011) e tem capacidade de tolerar ambientes poluídos, como esgoto, e de sobreviver em água tratada com cloro (NEYTS *et al.*, 2000; PALU *et al.*, 2006; DASKALOV, 2006; KINGOMBE *et al.*, 2010). Sua proliferação é inibida pela presença de bactérias heterotróficas, o que sugere que a competição por nutrientes é um fator limitante para a sua manutenção no meio ambiente (MARY *et al.*, 2001). As células podem se agrupar e formar um biofilme para, desta forma, resistirem a alterações ambientais bem como a ação do cloro (SINHA *et al.*, 2004).

A proliferação de *Aeromonas* spp. é maior em temperaturas médias a elevadas, e estas bactérias são mais frequentemente isoladas no verão (EDBERG *et al.*, 2007). Como estão amplamente disseminadas nos ambientes aquáticos, é alta a possibilidade de transmissão aos seres humanos por ingestão de água ou alimentos contaminados, bem como a infecção da pele por contato direto com água contaminada (SEN & RODGERS, 2004, SCOARIS *et al.*, 2008, JANDA & ABBOTT, 2010). As infecções causadas por *Aeromonas* spp. em seres humanos incluem septicemia, celulite, gastroenterite, peritonite, endocardite, meningite, infecções do trato urinário, doenças hepatobiliares, infecções oculares e pneumonia (SEN & RODGERS, 2004, WU *et al.*, 2007, KHAJANCHI *et al.*, 2010). Também já foram identificadas complicações como síndrome hemolítico-urêmica (BOGDANOVIC *et al.*, 1991 in SESHADARI, 2006) e fascíte necrotizante (ANGEL *et al.*, 2002; FOSSE *et al.*, 2004) além de infecções oportunistas em pessoas imunocomprometidas (MERINO *et al.*, 1995; CHOPRA & HOUSTON, 1999, KINGOMBE *et al.*, 1999, SCOGLIO *et al.*, 2001). Portanto, o gênero *Aeromonas* representa uma ameaça importante à saúde pública, e, além disso, também apresenta resistência a antibióticos (SCHRAG & WIENER, 1995; CONWAY & ROPER, 2000; DASZAK *et al.*, 2001).

O primeiro caso de infecção pelo gênero *Aeromonas* foi observado em 1954 em uma mulher Jamaicana e desde 1961, quando uma espécie de *Aeromonas* spp. foi isolada de fezes humanas, diferentes espécies vêm sendo identificadas como agentes causadores de diarreia (VON GRAEVENITZ, 2007). Casos de diarreia provocados por *Aeromonas* spp. tem sido descritos em todo o mundo, incluindo regiões desenvolvidas como a América do Norte e Europa (SVENUNGSSON *et al.*, 2000; JANDA & ABBOT, 2010) e em especial nos países em desenvolvimento (NOJIMOTO *et al.*, 1997; ALBERT *et al.*, 2000; ASSIS *et al.*, 2014). *Aeromonas* spp. também é uma das causas da “diarreia dos viajantes”. Isto foi bem documentado em estudo realizado com pacientes internados em um hospital na Espanha, devido à “diarreia do viajante”. *Aeromonas* spp. foram isoladas de parte dos pacientes, com prevalência das espécies *A. caviae* e *A. veronii* biovariedade *sobria* (VILA *et al.*, 2003).

Posteriormente, em 2004 quando houve o tsunami na Tailândia, bactérias do gênero *Aeromonas* foram identificadas como patógenos majoritários, representando mais de 20% dos isolados de ferimentos (DIXON, 2008).

Com relação às vias de infecção por *Aeromonas* spp, já foram demonstradas as vias por ingestão de água e alimentos contaminados, por contato de ferimentos com água contaminada, e raramente por mordida de cobras e outros répteis, e também de animais como ursos (KUNIMOTO *et al.*, 2004; JANDA & ABBOTT, 2010).

O gênero *Aeromonas* compreende 27 espécies (Quadro 1), sendo que algumas espécies tem um impacto mais relevante na saúde humana. Cerca de 90% dos isolados clínicos pertencem a três espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii sobria*. Elas estão associadas principalmente com gastroenterite em indivíduos saudáveis, septicemia, geralmente em indivíduos imunodeprimidos, e infecções em ferimentos (FARMER III *et al.*, 2006). Mas também são capazes de provocar outras infecções (MARTIN-CARNAHAN & JOSEPH, 2005; JANDA & ABBOTT, 2010).

O crescente número de casos e a gravidade das infecções causadas por *Aeromonas* spp. documentadas em todo o mundo levou a inclusão dessas bactérias na lista dos patógenos emergentes (BORCHADT *et al.*, 2003).

Aeromonas spp. é também um agente causador de hemorragia bacteriana e septicemia em peixes e está se tornando um grande problema para a indústria de piscicultura (LI *et al.*, 2011).

Vários mecanismos de virulência das bactérias do gênero *Aeromonas*, características que as tornam capazes de causar doenças em humanos, já são conhecidos (GRIM *et al.*, 2013, 2014), mas a patogênese das infecções ainda não foi bem esclarecida e nem foi estabelecido um modelo de infecção animal adequado para todas elas (EDBERG *et al.*, 2007; JANDA & ABBOTT, 2010).

QUADRO 1 - ESPÉCIES ATUALMENTE INCLUÍDAS NO GÊNERO *Aeromonas*.

ESPÉCIES	ORIGEM	AUTORES
<i>A. hydrophila</i>	Leite	Stainer, 1943
<i>A. salmonicida</i>	Salmão	Griffin <i>et al.</i> , 1953
<i>A. sobria</i>	Peixe	Popoff e Veron 1976
<i>A. media</i>	Água (rio)	Allen <i>et al.</i> , 1983
<i>A. veronii</i>	Muco	Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1987
<i>A. caviae</i>	Cobaia	Schubert e Hegazi, 1988
<i>A. schubertii</i>	Abscesso cutâneo	Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1988
<i>A. eucrenophila</i>	Peixe de água doce	Schubert e Hegazi, 1988
<i>A. jandaei</i>	Fezes humanas	Camahan <i>et al.</i> , 1991a
<i>A. trota</i>	Fezes humanas	Camahan <i>et al.</i> , 1991b
<i>A. allosaccharophila</i>	Enguia	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 1992b
<i>A. encheleia</i>	Enguia	Esteve <i>et al.</i> , 1995b
<i>A. bestiarum</i>	Peixe doente	Ali <i>et al.</i> , 1996
<i>A. popoffii</i>	Água potável	Huys <i>et al.</i> , 1997
<i>A. simiae</i>	Fezes de macaco	Harf-Monteil <i>et al.</i> , 2004
<i>A. molluscorum</i>	Molusco bivalve	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2004
<i>A. bivalvium</i>	Molusco bivalve	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2007
<i>A. aquariorum</i>	Água (Aquário)	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2008
<i>A. tecta</i>	Isolado clínico e ambiental	Demarta <i>et al.</i> , 2008
<i>A. piscicola</i>	Peixe	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009
<i>A. fluvialis</i>	Água (Rio)	Alperi <i>et al.</i> , 2010a
<i>A. sanarellii</i>	Ferida	Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. taiwanensis</i>	Ferida de queimadura	Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. diversa</i>	Ferida	Miñana-Galagis <i>et al.</i> , 2010
<i>A. rivuli</i>	Água (riacho)	Figueras <i>et al.</i> , 2011a
<i>A. cavernicola</i>	Água (riacho de caverna)	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2013
<i>A. australiensis</i>	Água(sistema de irrigação)	Aravena-Roman <i>et al.</i> , 2013

FONTE: ADAPTADO DE ALVES DA SILVA, 2015.

2.2 RNAs NÃO CODIFICADORES

O RNA é a macromolécula que tem função de manutenção e transmissão da informação gênica e de catalise durante a transcrição e a tradução, respectivamente (ZAHA *et al.*, 2014). Todos os tipos de RNAs, exceto os RNAs virais, são transcritos a partir do DNA genômico. Há três tipos mais conhecidos de RNAs:

a) RNA ribossomal (RNAr): associa-se a proteínas para formar os ribossomos. Representa 95% do RNA total da célula formando fitas duplas por pareamentos internos.

b) RNA mensageiro (RNAm): molécula de tamanho variável e vida curta, que contém informação para a síntese de peptídeos e proteínas.

c) RNA transportador (RNAt): responsável por transportar e acoplar os aminoácidos ao mRNA, pelo pareamento códon/anticódon, durante a síntese proteica (ZAHA *et al.*, 2014).

Os genes codificadores de peptídeos e proteínas, ou seja, genes codificadores de mRNA, estão presentes nas regiões codificadoras do genoma, e são identificados durante a anotação como fases de leitura abertas ou *open reading frames* (ORFs). No entanto, o genoma também contém genes codificadores de outros tipos de RNAs além dos ribossomais e transportadores, localizados em regiões conhecidas como regiões intergênicas ou *intergenic regions* (IRs). Essas moléculas são referidas como RNAs não codificadores (ncRNAs) e por muito tempo ficaram ocultas nos genomas ou não receberam a devida importância. Porém, a partir da década de 90 vários pesquisadores passaram a relatar a sua presença nos genomas e a sua participação em diversos processos essenciais para a manutenção das funções celulares (WASSARMAN *et al.*, 1999). Atualmente, é consenso que os ncRNAs formam uma classe de moléculas importantes que estão presentes nos domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* e estão envolvidos em vários processos celulares (Quadro 2) (ZAHA *et al.*, 2014).

QUADRO 2- CLASSE DE RNAs E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES

Tipo	Classe	Procaríoto	Eucarioto	Função
Codificador	mRNA (mensageiro)	Presença	Presença	Sequências síntese de proteínas
Não Codificador	rRNA (ribossômico)	Presença 70S(50S+30S)	Presença 80S(60S+40S)	Síntese de Proteínas
	tRNA (transportador)	Presença	Presença	Transportador de aminoácido ao local de síntese proteínas
	snoRNA (RNA nucleolar)	Ausência	Presença	Maturação de ribossomos e RNAs transportadores
	snRNA (RNA nuclear)	Presença	Presença	Síntese do mRNA eucariótico
	sRNA (RNA pequeno)	Presença	Presença	Modula a transcrição e a estabilidade de mRNAs
	CRISPR (RNA CRISPR)	Presença	Ausência	Sistema de defesa bacteriana
	miRNA (micro RNA)	Ausência	Presença	Silenciamento gênico pela inibição da tradução e cliva mRNAs
	siRNA (RNA interferência)	Ausência	Presença	Silenciamento gênico
	piRNA (RNA liga-se PIWI)	Ausência	Presença	Silenciamento gênico em células germinativas
	lncRNA (RNA longo)	Ausência	Presença	Regulação biológica e processos de desenvolvimento de doenças

FONTE: MODIFICADO DE ZAHA *et al.*, 2014.

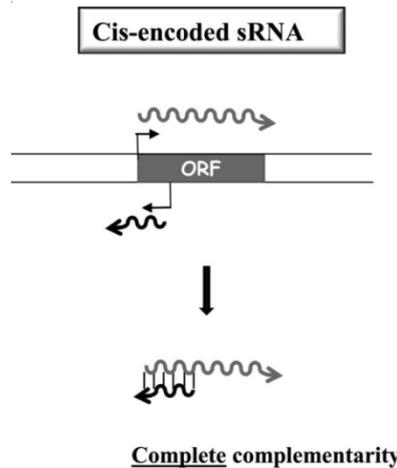
Em procariotos e arqueias, os ncRNAs podem ser classificados quanto à posição no genoma em relação ao seu alvo, o que reflete seu mecanismo de ação (SHARMA & VOGEL, 2009). Os *cis-encoded* ncRNAs são transcritos *in cis* antisenso em relação ao alvo e os *trans-encoded* ncRNAs são transcritos a partir de regiões intergênicas distantes do gene alvo (WATERS & STORZ, 2009). O pareamento antisenso entre o ncRNA regulatório e o alvo é o mecanismo de ação mais comum (MASSÉ & GOTTSMAN, 2002; SHARMA & VOGEL, 2009). Essa interação ocorre em regiões curtas e de complementariedade perfeita, no caso dos *cis-encoded antisense* ncRNAs, ou imperfeita, no caso dos *trans-encoded* ncRNAs (ELLIS *et al.*, 2015). O tamanho desses ncRNAs pode variar de 50 até 600 pares de bases e eles correspondem à maior parte dos ncRNAs regulatórios em procariotos (PICHON & FELDEN, 2008).

Os primeiros ncRNAs identificados em uma bactéria datam da década de 70 e essas moléculas foram nomeadas de 6S e 4.5S, respectivamente (WASSARMAN *et al.*, 1999). Foram localizadas utilizando eletroforese de gel de poliacrilamida (WASSARMAN *et al.*, 1999). A partir desta descoberta, centenas de genes candidatos a codificadores de ncRNAs com função regulatória tem sido descritos (MEYER *et al.*, 2011; TOHMASON *et al.*, 2015).

Cis-encoded antisense ncRNAs

Essa classe de ncRNA, também denominada *cis-asRNAs*, é encontrada tanto em bactérias como em arqueias (DENNIS & OMER, 2005). Os genes são expressos como sequências complementares de mRNAs que correspondem aos seus alvos, no mesmo locus gênico, e a função regulatória é exercida através do pareamento, com alto grau de complementariedade, com o mRNA alvo (Figura 1) (PRASSE, 2013). Por isso, a ligação *cis-asRNA/mRNA* alvo produz um duplex, alterando a estabilidade do mRNA, induzindo a estabilidade ou degradação do duplex. Essas moléculas participam da indução ou inibição da expressão gênica, da inibição da tradução, da regulação da replicação de plasmídeos e da conjugação (GEORGE; HESS, 2011).

FIGURA 1 - PAREAMENTO DE UM *CIS-ENCODED* ncRNA COM O SEU ALVO.



O ncRNA é transcrito *in cis* antisenso em relação ao mRNA alvo, no mesmo locus gênico. Por isso, ocorre o perfeito pareamento de bases entre o par ncRNA/mRNA alvo.

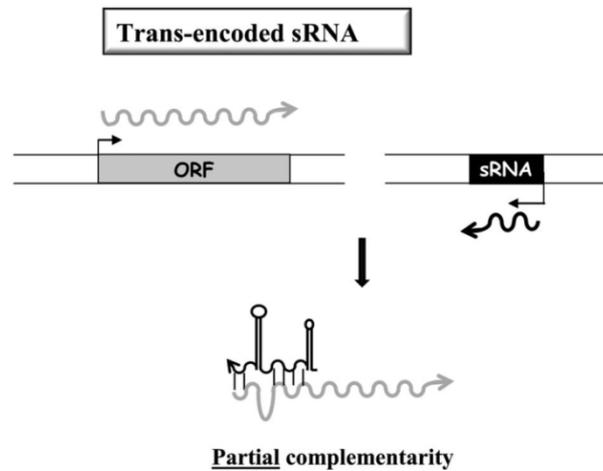
FONTE: PRASSE *et al.*, 2013.

***Trans-encoded* ncRNAs**

Os *trans-encoded* ncRNAs são transcritos no sentido *trans* e a partir de genes localizados em regiões afastadas dos seus alvos (Figura 2). O pareamento de bases ncRNA/mRNA alvo, ao contrário dos *cis-encoded antisense* ncRNAs, é parcialmente complementar e geralmente dependente da proteína Hfq, uma chaperona de RNA (WATERS & STORZ, 2009). Por esses motivos esta classe de ncRNAs pode parear com diversos alvos (GOTTESMAN, 2005; PRÉVOST *et al.*, 2007).

O pareamento de bases entre um *trans-encoded* ncRNA e seu mRNA alvo geralmente leva à inibição da tradução, degradação do mRNA, ou ambos. Ele ocorre principalmente na região 5'UTR do mRNA, bloqueando o sítio de ligação ao ribossomo (Figura 3) (HOE *et al.*, 2013). O duplex ncRNA/mRNA alvo é então degradado pela RNaseE.

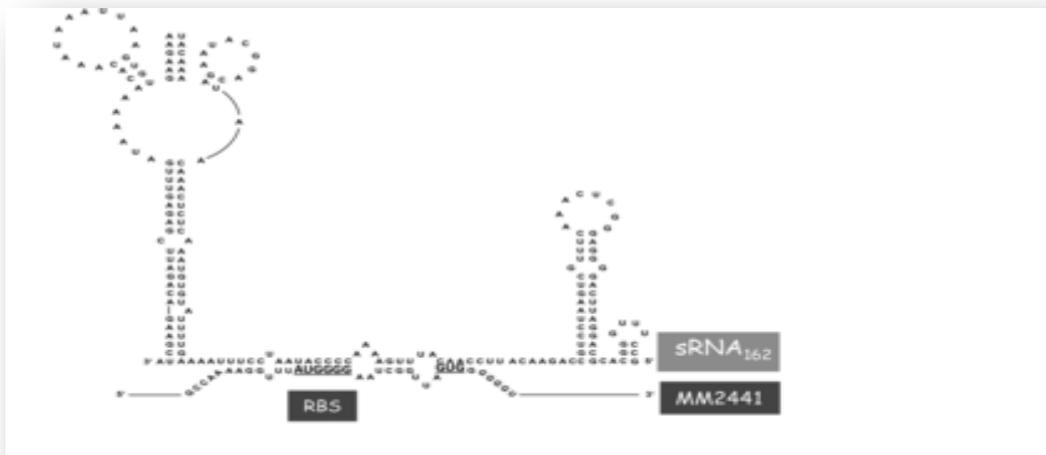
FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DE UM *TRANS-ENCODED* ncRNA EM RELAÇÃO AO ALVO E SEU MODO DE AÇÃO



O pareamento de um *trans encoded* ncRNA com o seu mRNA alvo não é perfeito uma vez que os genes estão alocados em regiões distantes no genoma.

FONTE: PRASSE *et al.*, 2013.

FIGURA 3 - DETALHE DO PAREAMENTO DE UM *TRANS-ENCODED* ncRNA COM SEU ALVO



Pareamento geralmente oclui, total ou parcialmente, o sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e isso impede a síntese da proteína. Na figura, o RBS do mRNA MM2441 de arqueia está bloqueado pelo pareamento com o *trans encoded* ncRNA.

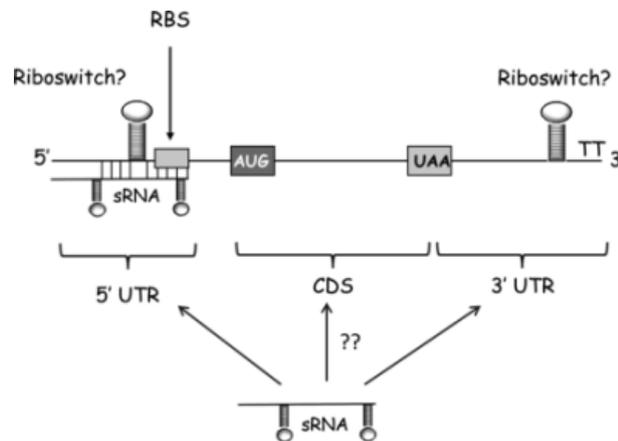
FONTE: PRASSE *et al.*, 2013.

Riboswitches

Riboswitches são sequências localizadas na região 5' UTR ou, menos frequentemente, na região 3' UTR de um dado mRNA (BREAKER, 2012). São

capazes de regular a transcrição do gene a jusante ao servirem como receptores de metabólitos específicos que modificam sua estrutura secundária. Estas sequências apresentam dois domínios distintos, o aptâmero e a plataforma de expressão que estão parcialmente sobrepostos. No início da transcrição ocorre o dobramento do domínio aptâmero a potencial ligação do metabólito, e isso leva o domínio plataforma de expressão a assumir a forma de um grampo antiterminador ou de um grampo terminador rho-independente (Figura 4) (BREAKER, 2012, WATERS & STORZ, 2009). A expressão gênica é controlada pela terminação da transcrição, pela inibição da tradução, quando há sequestro do RBS, ou pela degradação do RNA mensageiro.

FIGURA 4 - RIBOSWITCH



Riboswitches são classificados como elementos *cis-encoded*, podem estar localizadas na região 5' UTR e menos frequente na região 3' UTR. São utilizados para a terminação da transcrição do mRNA e na iniciação da tradução, podem inibir a expressão gênica e impedir a tradução, quando há o sequestro do RBS.

FONTE: PRASSE *et al.*, 2013.

RNAs não codificadores Hfq dependentes

A proteína Hfq foi descoberta em 1968 como um fator hospedeiro de *Escherichia coli* que era essencial para a replicação do bacteriófago Q β . Hoje se sabe que Hfq é uma proteína de ligação de RNAs bacterianos e que esta envolvida em papéis fisiológicos importantes que são geralmente mediados pela interação da Hfq com o RNA não codificador (DAVIS & WALDOR, 2007).

A interação entre Hfq e RNA não codificador facilita a regulação traducional do mRNA em resposta ao *stress* ambiental e mudanças nas concentrações de metabólitos. Esta interação está envolvida também na regulação de respostas ao *stress* mediado pelos fatores sigma RpoS, sigma-E e sigma-32 (ZHANG *et al.*, 2003).

RNAs não codificadores que regulam a atividade de proteínas

Existem ncRNAs capazes de se ligar a proteínas para regular a sua função (MOREIRA, 2010). Um exemplo desse tipo de ncRNA é o RNA 6S que foi identificado por Hindley em 1967, em *Escherichia coli* (MIKULÍK, 2003). A partir dos anos 2000 o RNA 6S foi predito através de ferramentas computacionais e experimentalmente analisado em diversas espécies bacterianas (STEUTEN *et al.*, 2014).

Esse RNA regula a atuação da RNA polimerase (RNAP), e é altamente expresso na fase estacionária. Ele sequestra quase toda σ^{70} RNAP holoenzima na fase estacionária tardia e com isso contribui para adaptação transcricional bacteriana nessa fase, em que há aumento da transcrição de promotores σ^S -dependentes (TROTOCHAUD & WASSARMAN, 2004; WENHER *et al.*, 2014; STEUTEN *et al.*, 2014). Quando as células reencontram um ambiente nutricional favorável elas podem reativar a atividade metabólica. Uma vez que o 6S RNA ocupa o sítio ativo da RNA polimerase ele pode ser usado como molde para a síntese abortiva de fragmentos de 6S RNA com 14 a 20 nucleotídeos, os pRNA (*RNA products*), especialmente na retomada da atividade metabólica (WASSARMAN, 2007). Os complexos formados por 6S RNA:RNAPol:pRNA são muito instáveis e provocam a liberação do duplex 6S RNA:pRNA da RNA polimerase e a consequente retomada da capacidade de transcrição (WASSARMAN, 2007).

2.3 PREDIÇÃO E VALIDAÇÃO DE ncRNAs

Alguns ncRNAs atuam como potentes reguladores da expressão gênica ou da atividade proteica (WATERS & STORZ, 2009). Podem regular diversos eventos,

variando do sensoriamento ambiental à patogênese (TJADEN *et al.*, 2006; BACKOFEN & HESS; 2009). Em bactérias patogênicas, participam de eventos relacionados com a virulência, com a resposta a antibióticos bem como com a expressão gênica induzida pelo hospedeiro (PAPENFORT & VOGEL, 2010). A disponibilidade de aproximadamente 2.200 genomas procarióticos em bases de dados públicos tem facilitado a busca computacional por estes ncRNAs que deve ser seguida de validação experimental (HUTTENHOFER *et al.*, 2005).

A maioria das ferramentas computacionais é aplicada para localizar genes putativos e essa triagem simplifica o processo de identificação de ncRNAs em bactérias (JOHANSSON & COSSART, 2003). A bioinformática tem colaborado para o aumento significativo da descoberta de RNAs curtos não codificadores em bactérias patogênicas ou não. Tecnologias como *microarray* e sequenciamento massivo de RNA (RNAseq) também tem contribuído para o aumento significativo do número de ncRNAs (SHARMA & VOGEL, 2009). A esses estão sendo atribuídos muitos papéis funcionais (PAPENFORT & VOGEL, 2010), mas alguns, até o momento, permanecem desconhecidos.

Em paralelo, foi necessária a criação de plataformas computacionais eficientes para o armazenamento e anotação desta categoria de moléculas. A maioria das sequências de ncRNAs conhecidos, validada ou não, está depositada no banco de dados Rfam, que contém uma coleção de famílias de RNAs e está hospedado no European Bioinformatics Institute. *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* figuram como organismos de referencia nos bancos de dados.

Com o advento das mais novas tecnologias para predição de ncRNAs, viu-se a necessidade de confirmar esses preditos, o RNAseq surgiu então com essa abordagem de propor uma nova tecnologia que confirmasse os ncRNAs preditos pelas ferramentas.

2.3.1 PREDIÇÃO DE RNAs NÃO CODIFICADORES

Os genes que codificam proteínas são identificados por meio de diversos algoritmos concebidos para identificar um conjunto de sinais nas sequências de DNA que caracterizam uma ORF (ZAHRA *et al.*, 2014). No caso dos genes codificadores de ncRNAs, os principais conceitos usados em preditores de ORFs não puderam ser

utilizados, pois não existem, por exemplo, códons de início e término de tradução e sítio de ligação ao ribossomo. Os primeiros preditores de ncRNAs basearam-se na busca por sequências promotoras e sítio de ligação para fator de transcrição conservados e terminador Rho-independente, em regiões intergênicas (RIVAS *et al.*, 2001). Com o passar do tempo, as ferramentas passaram a incorporar algoritmos para anotação gênica, estatística de composição de bases, e predição de estrutura secundária em sequências de RNA não conservadas e estabilidade termodinâmica (PICHON & FELDEN, 2008).

São exemplos de ferramentas preditoras de ncRNAs em bactérias: sRNAPredict (LIVNY *et al.*, 2005), TransTermHP (KINGSFORD *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2009), sRNAPredict3, SIPHT, sRNAscanner e sRNAfinder (LIVNY *et al.*, 2008; SRIDHAR *et al.*, 2010)

Uma ferramenta bastante utilizada é o Infernal versão 1.1.1 que utiliza um modelo de covariância baseado na construção de estruturas secundárias de uma família de RNA e pesquisa base de dados de sequência de estrutura de RNAs semelhantes. Realiza uma pesquisa de homologia, seguido pela estrutura secundária com base em alinhamentos múltiplos, a última versão utiliza 4 ferramentas – CMBUILD, para construção das estruturas secundárias; CMCALIBRATE, calcula parâmetros para o e-valor; CMSEARCH, para buscar sequências e estruturas semelhantes e CMALIGN, para alinhar as sequências. O e-valor é atribuído para alinhamentos de RNA e prever, assim, os locais do RNA não codificante (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2007).

Com a popularização do método RNAseq, surgiu a ferramenta *Cufflinks* que combina análise de sequências de DNA e resultados do sequenciamento de RNA. (TRAPNELL *et al.*, 2010).

2.3.2 VALIDAÇÃO DE RNAs NÃO CODIFICADORES

A validação experimental de candidatos preditos por bioinformática é uma etapa importante para confirmar que uma molécula candidata esta envolvida na regulação de processos biológicos. Como já mencionado, os ncRNAs estão envolvidos na modulação da transcrição e da tradução, na estabilidade do mRNA e também no estabelecimento da virulência em bactérias patogênicas, entre outros. A

literatura está repleta de artigos referentes à detecção de ncRNAs, em procariotos e arqueias, por abordagem bioinformática e muitos dos candidatos permanecem sem validação ou com função desconhecida. Dentre os métodos experimentais para a validação deste grupo de moléculas tem destaque o *Northern blotting* e o *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) (PALADON-BRAUCH *et al.*, 2008; LÓPES-GOMOLLÓN, 2011; KHOO, *et al.*, 2012). No primeiro método, o RNA purificado é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida e o ncRNA é detectado pelo uso de oligonucleotídeos sonda. No segundo método, o RNA purificado é utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA) que é então usado como molde para o PCR quantitativo, com oligonucleotídeos iniciadores (primers) que deverão alinhar com as sequências de ncRNAs candidatas.

Os avanços recentes na preparação de bibliotecas de RNA e a disponibilidade de plataformas de sequenciamento de nova geração popularizaram o método de sequenciamento massivo de RNA (RNA-seq). Esta se tornou a estratégia preferencial para análise do perfil de expressão de mRNA e também de ncRNAs (transcriptoma).

É um método baseado no sequenciamento de fragmentos de cDNA (DNA complementar), obtidos de uma biblioteca de RNA purificado de células mantidas em condições fisiológicas específicas. Desta forma, o transcriptoma representa o perfil de expressão gênica de um organismo em um dado momento metabólico (WANG *et al.*, 2009). No que se refere aos ncRNAs, diversas moléculas deste grupo já foram detectadas em diferentes organismos por essa abordagem (D'ANTONIO *et al.*, 2015; NEUHAUS *et al.*, 2017).

2.3.3 PREDIÇÃO DE ALVOS DE RNAs NÃO CODIFICADORES

Uma consequência natural da descoberta dos ncRNAs que interagem com mRNAs alvos foi a necessidade de saber quem são essas moléculas. Testes e validações experimentais de alvos são laboriosos, caros e, em alguns casos, carecem de modelos biológicos adequados. A aplicação da abordagem bioinformática tornou-se importante para minimizar o esforço em laboratório e nos anos 2000 começaram a aparecer ferramentas para predição de alvos de ncRNAs. Tinha-se a expectativa de se obter redes de interação entre ncRNAs e mRNAs e de

se poder fazer correlações entre espécies geneticamente não relacionadas. A previsão *in silico* de mRNAs alvo, no entanto, mostrou-se ser um desafio devido à elevada heterogeneidade dos ncRNAs em tamanho e estrutura e, também, ao fato da complementaridade com o alvo ser imperfeita (VOGEL & WAGNER, 2007).

As ferramentas preditoras de alvos mais em evidência são: CopraRNA, IntaRNA, RNAplex, RNAup, TargetRNA2, RNAhybrid, RNAduplex, RNAcofold, Pairfold (PAIN *et al.*, 2015).

O TargetRNA2 é um servidor web que identifica alvos de ncRNAs *trans-encoded* em bactérias e arqueias. Ele calcula scores de hibridização ótimos para pares ncRNAs\ mRNA alvo e fornece uma lista de mRNAs alvos candidatos (VOGEL & WAGNER, 2007). O TargetRNA2 trabalha com as possibilidades das regiões mais estáveis, ou seja, as regiões mais propensas a serem regiões alvo (KERY *et al.*, 2014). Neste projeto optou-se pelo uso do TargetRNA2 pois ele apresenta uma plataforma acessível ao usuário e fornece dados de alinhamento.

2.4. ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS ncRNAs BACTERIANOS

A estrutura secundária do RNA é um passo intermediário na formação da estrutura tridimensional. Ela é formada por regiões de fita dupla formada pelo dobramento da molécula sobre si própria. Para que essas regiões ocorram, uma subsequência de bases em um sentido precisa ser complementar a outra subsequência de bases no sentido oposto. Os principais pares formados são G/C (três ligações de hidrogênio), A/U (duas ligações de hidrogênio) e G/U (duas ligações de hidrogênio) (AMABIS & MARTHO, 2004).

Além disso, também existem interações terciárias no RNA que são interações entre estruturas secundárias, que não são previsíveis por ferramentas de predição secundária, mas podem ser encontradas por análise de covariância (GRIFFITHS-JONES, 2006).

Um método para predição da estrutura secundária do RNA consiste em escolher os conjuntos de pares de bases complementares que resultam nas moléculas energeticamente mais estáveis. A partir disso, estruturas com energias quase tão estáveis quanto a mais estável podem ser produzidas, e as regiões cujas

predições são as mais confiáveis podem ser identificadas (SANTOS & CASTRO, 2000).

O RNAfold, é uma ferramenta que prevê estruturas secundárias de sequências de DNA ou RNA de cadeia simples (LOREN *et al.*, 2011).

2.5 SISTEMAS DE SECREÇÃO EM BACTÉRIAS

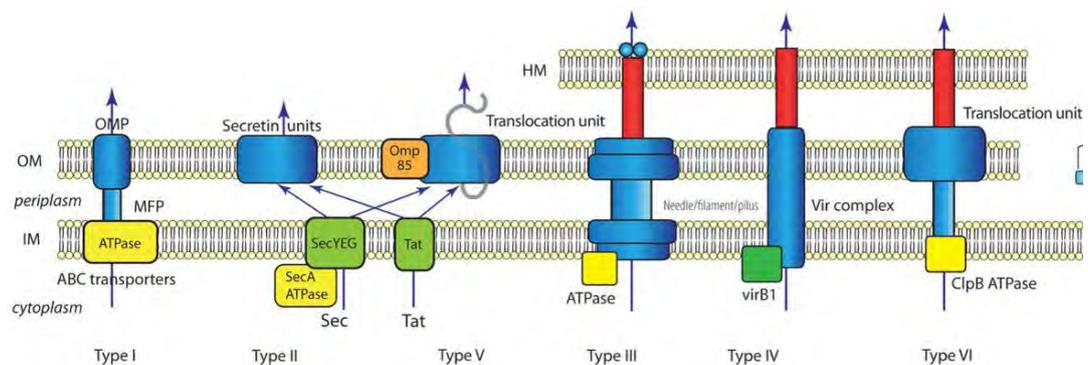
Bactérias apresentam nanomáquinas moleculares altamente especializadas, que secretam uma ampla variedade de substratos que desempenham funções importantes na resposta ao ambiente e também em processos fisiológicos tais como adesão, patogenicidade, adaptação e sobrevivência (COSTA *et al.*, 2015). Em bactérias gram-negativas estes aparatos podem se localizar na membrana externa ou abranger membrana interna e externa, atravessando-as e formando um canal extracelular (DUONG & WICKNER 1997; REMAUT & WAKSMAN, 2004). Os sistemas de secreção são classificados em 6 tipos diferentes (Figura 5):

- Tipo I: sua função é secretar uma variedade de proteínas do citoplasma para o meio extracelular (HUECK 1998; REMAUT & WAKSMAN 2004). Em bactérias gram-negativas patogênicas, os produtos secretados frequentemente estão associados com a aquisição de nutrientes ou virulência (COSTA *et al.*, 2015).
- Tipo II: faz a secreção de proteínas dobradas do periplasma para o meio extracelular, seus substratos incluem várias enzimas hidrolíticas importantes para a sobrevivência bacteriana e exoenzimas relacionadas à degradação de tecidos do hospedeiro (PUGSLEY 1993, COSTA *et al.*, 2015).
- Tipo III: promovem a transferência de proteínas efetoras da bactéria diretamente para dentro do citoplasma das células do hospedeiro, onde modulam diversas funções biológicas, como expressão gênica, progressão do ciclo celular e funções bioquímicas. São importantes fatores de virulência em bactérias gram-negativas como *Salmonella*, *Yersinia* entre outras (HE, 2004).
- Tipo IV: complexos proteicos que atravessam o envelope bacteriano promovendo a translocação de proteínas ou DNA para o interior de células-alvo ou para o meio extracelular. Membros desta família são responsáveis pelo processo de conjugação ou exercem papel essencial na virulência em várias espécies de bactérias (CHRISTIE, 2004).
- Tipo V: localizados na membrana externa, incluem os autotransportadores. São sintetizadas como grandes precursores contendo um domínio translocador e um domínio passageiro, que constitui o domínio funcional secretado da proteína. O domínio translocador é dirigido ao sistema Sec e após atravessar a membrana interna é montado na membrana externa e então o domínio passageiro é

transportado. Muitas dessas proteínas têm funções associadas com virulência (THANASSI *et al.*, 1998; GRIJPSTRA *et al.*, 2013).

- Tipo VI: apresenta uma estrutura, que se assemelha a cauda de bacteriófagos, ancorada no envelope celular através de complexos proteicos associados às membranas bacterianas (CIANFANELLI *et al.*, 2016). Transporta diversas proteínas efetoras diretamente nas células alvo de uma maneira contato-dependente. As proteínas secretadas desempenham funções nas interações entre bactérias e hospedeiro, interação com outras bactérias e interações com o ambiente (CIANFANELLI *et al.*, 2016; GREEN & MECSAS, 2016).

FIGURA 5 – SISTEMAS DE SECREÇÃO BACTERIANOS



Estrutura dos sistemas de secreção bacteriana. HM: membrana do hospedeiro; OM: membrana externa; MM: micomembrana; OMP: membrana externa proteína; MFP: proteína de fusão de membrana. ATPases e chaperonas são mostradas em amarelo.

FONTE: MODIFICADO TSENG *et al.*, 2009

Um sistema de secreção do tipo VII foi descrito em 2007 em *Mycobacterias* (ABDALLAH *et al.*, 2007) e um sistema do tipo VII-like em *S. aureus*, que secreta a toxina EsaD que tem como alvo bactérias competidoras, foi recentemente reportado (ANDERSON *et al.*, 2011 & CAO *et al.*, 2016).

2.6 ILHAS DE PATOGENICIDADE EM PROCARIOTOS

Segundo Hacker e colaboradores (1990) ilhas de patogenicidade (PAI's) são grandes conjuntos gênicos que apresentam propriedades diferentes do restante do genoma e contem pelo menos um gene que possa ser associado a um processo patológico. Dentre as propriedades conferidas pelas ilhas de patogenicidade,

destacam-se a capacidade do organismo aderir e invadir o epitélio das células hospedeiras, produzir toxinas, captar ferro do meio ambiente e sintetizar o sistema de secreção do tipo III (GROISMAN & OCHMAN, 1996).

As PAI's podem codificar vários fatores de virulência importantes: as adesinas, que possibilitam aos microrganismos a colonização dos tecidos, as toxinas, as invasinas, os sistemas de captação de ferro e os fatores que abolem as defesas do hospedeiro. Além disso, a aquisição de genes que permite a resistência a drogas antimicrobianas tornou-se um elemento adicional ao arsenal de virulência das bactérias (MOTA; SORG & CORNELIS, 2005; JUHAS *et al.*, 2009).

Em geral, quando sistemas de secreção estão presentes em ilhas de patogenicidade, as proteínas exportadas causam, ou ajudam a causar, danos às células hospedeiras, em favor da sobrevivência e multiplicação bacteriana (DEAN; MERESCA & KENNY, 2005).

As regiões ocupadas pelas PAI's tem entre 10.000 a 20.000 pares de bases, apresentam conteúdo GC diferente do restante do genoma, estão associadas a genes que codificam tRNA e/ou a fagos temperados. Nas extremidades das ilhas podem ser observadas sequências de inserção de integrases (elementos envolvidos na mobilidade genética), indicando a presença de *hot spots*, ou seja, locais no genoma onde a inserção ou deleção é facilitada. Isso fornece pistas de que a transferência horizontal de grandes fragmentos de DNA seja provavelmente o meio para aquisição de novos fatores de virulência pelas bactérias (LLOYD; RASKO & MOBLEY, 2007).

2.6.1 PREDIÇÃO DE ILHAS DE PATOGENICIDADE EM PROCARIOTOS

As ferramentas de predição de ilhas genômicas abordam diferentes metodologias. O ZIsland utiliza um método baseado no perfil GC cumulativo, que detecta a variação significativa do conteúdo GC entre a ilha e o restante do genoma. Como resultado obtém-se um gráfico mostrando os picos de GC% que delimitam as ilhas (WEI *et al.*, 2016). A ferramenta GIPSy se baseia no conteúdo GC, uso de códons, presença de genes de transposase; fatores de virulência, metabolismo, resistência a antibióticos ou simbiose; proximidade a genes de tRNA e ausência em outros organismos do mesmo gênero ou espécies intimamente relacionadas

(SOARES *et al.*, 2015). Como resultado obtém-se dados estatísticos do conteúdo GC, desvio do uso de códons e porcentagem dos fatores de virulência. A ferramenta IslandViewer utiliza três ferramentas: IslandPick, que avalia a precisão do método de predição de ilhas genômicas; IslandPath-Dimob, que avalia a presença de genes e elementos funcionais móveis presentes nas ilhas e SIGI-HMM que mede o uso de códons para identificar possíveis ilhas (LANGILLE *et al.*, 2008). Como resultado obtém-se, um genoma circular indicando as prováveis regiões de ilhas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

RNAs não codificadores regulatórios e seus alvos em bactérias do gênero *Aeromonas*

Jean Carlos M. da Costa, Alexandre R. Paschoal, Cyntia Maria T. F. Picheth, Karoline Prediger, Maria Berenice R. Steffens

Abstract

Background: The *Aeromonas* spp are Gram-negative bacteria that do not form spores and are chemoorganotrophic and facultative anaerobes. The first genus description dates from the late nineteenth century, however the genus was only set after a phylogenetic analysis of 16S rRNA in 1992, establishing a new *Aeromonas* genus, which comprises the Aeromonadaceae family, Aeromonadales order, Proteobacteria class and subclass gammaProteobacteria. This bacterium has a high degree of pathogenicity causing opportunistic infections. In Bacteria, non-coding RNAs with regulatory function (ncRNAs) can modulate physiological responses and act by different mechanisms such as RNA-RNA pairing bases and RNA-protein interactions. Technologies for non-coding RNA prediction analysis such as the Infernal program (Inference RNA Alignment), can predict different types of ncRNAs, indicating that the amount of regulatory ncRNAs can be higher than previously thought. Traditionally, these approaches and more advanced technologies, such as RNA-Seq, allows to identify ncRNAs involved with the virulence process, biofilm formation, resistance to antibiotics and survival.

Results: The aim of this study was to identify ncRNAs present in the *Aeromonas* strains: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota* and *A. veronii*. The genomes deposited in the NCBI database were used as input data for the Infernal 1.1.1 tool. The output data were separated into ribosomal RNAs, transfer RNAs and ncRNAs. The ncRNAs were classified as smallRNAs, regulatory ncRNAs and riboswitches. The identity of ncRNAs was determined on the Rfam database. The TargetRNA2 software was used for target prediction. A total of 231 ncRNAs were found. Fifty

ncRNAs were assigned as regulatory, 6 as *riboswitches*, and 175 as ribosomal and transfer RNAs.

Conclusions: We identified regulatory ncRNAs that acts *in cis*, ncRNAs that associates with Hfq, ncRNAs involved in virulence, pathogenicity, responsible for biofilm formation and cell survival. We also predicted the mRNAs targets for *Aeromonas* spp. and analyzed the transcription profile of the of *A. veronii sobria* 312M in the presence of sodium desoxicolate. The expression of 6S smallRNA was higher than control and the expression of CsrB and PrrB_RsmZ was lower than control. These results indicate the metabolic adaption of *A. veronii* bv *sobria* 312M.

Keywords: *Aeromonas*, ncRNA regulatory, bacterium, pathogenicity, non-coding.

BACKGROUND

Aeromonas spp. são bactérias gram-negativas patogênicas, ubiqüitárias de ambientes aquáticos e amplamente disseminadas na natureza, anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas e não formam esporos¹. Essas bactérias são mais frequentemente isoladas no verão e estão distribuídas universalmente². As infecções podem ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados, causando infecções locais, sistêmicas e extra-intestinais³.

Os primeiros isolados do gênero *Aeromonas* spp. datam o final do século XIX, mas só em 1992 depois de uma análise filogenética do rRNA 16S levou a descrição de uma nova família Aeromonadaceae, do gênero *Aeromonas*, ordem Aeromonadales, classe Proteobactéria e subclasse GammaProteobacteria⁵.

O primeiro caso de infecção por *Aeromonas* spp. foi observado em 1954 em uma mulher na Jamaica⁶, desde então este patógeno se sobressai em diversas catástrofes, como o tsunami que atingiu a Tailândia em 2004, em que houve a prevalência de isolados do gênero *Aeromonas*⁷, assim como no episódio da “diarréia dos viajantes” que acometeu cidadãos espanhóis em 2001, acometendo principalmente pessoas imunocomprometidas. Por isso, bactérias desse gênero passaram a ser consideradas patógenos emergentes e oportunistas⁸.

Ilhas genômicas são grandes elementos genéticos que apresentam propriedades diferentes do restante do genoma, e tem pelo menos um gene que possa estar associado a algum processo patológico⁹. Dentro das ilhas de patogenicidade além de genes e proteínas relacionados com a virulência são encontrados sistemas de secreção que transportam substâncias de dentro do seu organismo para fora ou vice-versa¹⁰. Dentre os seis tipos bem descritos destacam-se os do tipo III e tipo VI¹¹. O sistema do tipo III é o mais importante fator de virulência em bactérias gram-negativas. Esse sistema permite que proteínas efetoras bacterianas sejam transportadas para dentro do citoplasma das células do hospedeiro, onde modulam diversas funções biológicas, como expressão gênica, progressão do ciclo celular e funções bioquímicas¹². Sistemas de secreção do tipo VI transportam diversas proteínas efetoras diretamente nas células alvo de uma maneira contato-dependente. As proteínas secretadas desempenham funções nas interações entre bactérias e hospedeiro, interação com outras bactérias e interações com o ambiente¹³. Ambos representam importantes fatores de virulência em bactérias enteropatogênicas.

RNAs não codificadores (ncRNAs) estão presentes nos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, podendo ter função regulatória, podem atuar *in cis* (*cis encoded* ncRNAs) ou *in trans* (*trans-encoded* ncRNAs). Os *cis encoded* ncRNAs são transcritos antisense ao seu mRNA alvo e a regulação ocorre através do perfeito pareamento de bases. Isso influencia no tempo de meia-vida e estabilidade dos mRNAs alvos¹⁴. Os *trans-encoded* ncRNAs são transcritos em regiões genômicas distantes do seu mRNA alvo com quem tem pouca complementariedade de bases. Comumente se ligam a sequências próximas ou sobrepostas ao sítio de ligação do ribossomo do mRNA e regulam o processo de tradução, aumentando ou diminuindo a estabilidade do mRNA¹⁵⁻¹⁶. Durante a interação com o alvo podem necessitar de uma chaperona, mais comumente a proteína Hfq¹⁷. Outra classe de ncRNAs são os *riboswitches* que constituem domínios complexos e enovelados de RNA localizados na região 5'-UTR do mRNA e promovem a regulação transcricional após ligarem metabólitos específicos e sofrerem mudanças estruturais¹⁸. Alguns ncRNAs também podem estar associados a proteínas, como é o caso do ncRNA 6S que sequestra quase toda RNA polimerase holoenzima na fase estacionária tardia e com isso contribui para adaptação transcricional do crescimento da fase estacionária¹⁹.

Nesse sentido, os ncRNAs estão envolvidos em variados processos como: virulência, metabolismo, resistência a antibióticos e simbiose³.

Neste trabalho investigamos a existência de ncRNAs regulatórios no gênero *Aeromonas* espécies *A. hydrophila*, *A. trota*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. sobria*, utilizando abordagens de predição de bioinformática e confirmação da expressão por sequenciamento de RNA. Como resultado da predição e análise da expressão encontramos ncRNAs envolvidos em atividade regulatória e *riboswitches*, ambos envolvidos em mecanismos de virulência, através da atuação dos seus alvos preditos. Alguns desses alvos foram visualizados em ilhas genômicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Conjuntos de dados

As sequências usadas neste projeto foram coletadas do NCBI no dia 18 de Janeiro de 2016. Foram utilizados os genomas completos das seguintes espécies de *Aeromonas*:

- *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 NC_008570.1;
- *Aeromonas veronii* B565 NC_015424.1;
- *Aeromonas veronii* bv *sobria* PRJEB7051 contig F329 e contig 25;
- *Aeromonas veronii* bv *sobria*;
- *Aeromonas trota* 1999 LCR;
- *Aeromonas caviae*: NZ_CDBK01000014.1 PRJEB7024; NZ_JTBH01000001.1 FDAAR605-75; NZ_LFH01000022.1 8LM; NZ_JOVP010000028.1 YL12; NZ_JWP0100006.1 L12; NZ_LFX001000026.1 A23; NZ_CACP01000025.1 Ae 398 e NZ_CDB501000012.1 PRJEB7046.

Identificação/anotação de ncRNAs e predição de alvos

Os conjuntos de dados extraídos do GenBank foram processados na ferramenta Infernal²⁰, versão 1.1.1 com bitscore mínimo de 24% e com modelos de covariância extraídos do banco de dados Rfam 12.1. Para identificação e anotação de ncRNAs foi utilizado o aplicativo Artemis, assim como o BlastN para o alinhamento das sequências de ncRNAs.

Para a predição dos alvos dos ncRNAs regulatórios foi utilizado a ferramenta TargetRNA2²⁶. Para a predição de ilhas genômicas foram utilizadas as ferramentas GIPSy⁶³, IslandView⁶⁴ e ZIsland⁶⁹. Para a construção das estruturas secundárias utilizou-se a ferramenta RNAfold⁷¹.

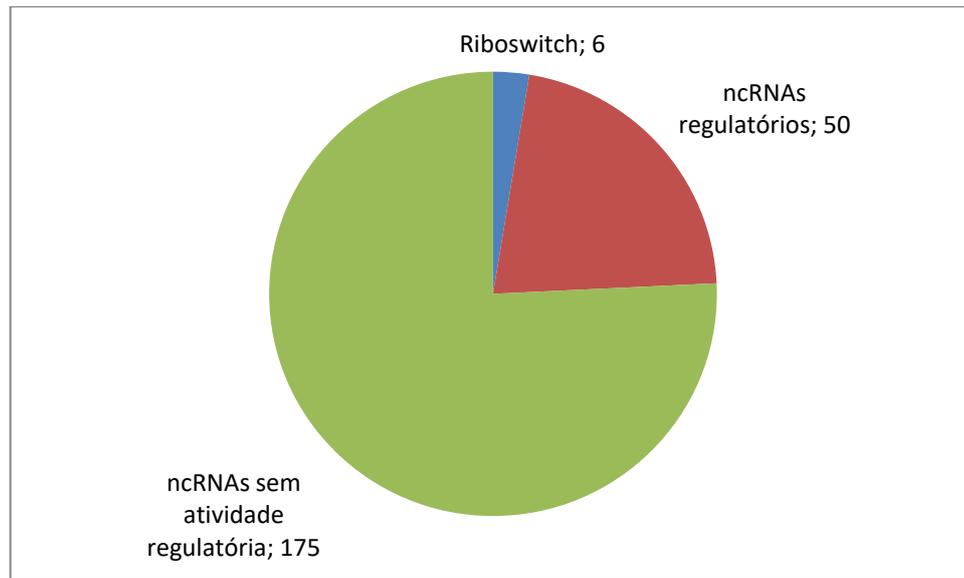
Análise de dados de RNA-seq

Para o RNA seq²¹ foi utilizada uma condição controle em meio de cultura BHI²²⁻²³ e uma condição experimental que consistiu em adicionar desoxicolato de sódio a 0,1% ao meio de cultura. O RNA foi extraído utilizando o “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche) conforme as instruções do fabricante. A quantificação de RNAs nas amostras foi realizada no Nanodrop e Qubit (Fluorometer Qubit R2.0. Invitrogen). Para a análise da integridade do RNA as amostras foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel de agarose 1%, em tampão borato de sódio uma vez, pH 8,0 e os géis foram corados com brometo de etídeo. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit “High capacity RNA-to-cDNA”²⁴. O sequenciamento do cDNA foi realizado na plataforma ION PRÓTON tm system²⁵. A análise de qualidade foi feita pela ferramenta FASTQC e as sequências foram analisadas pela ferramenta CLC.

RESULTADOS

RNAS não codificadores preditos

Empregando a ferramenta Infernal versão 1.1.1 foram obtidos 50 ncRNAs e 6 *riboswitches* que desempenham algum papel regulatório (Figura 6). Além disso, foram preditos 175 ncRNA sem função regulatória, tais como rRNAs e tRNAs.

FIGURA 6 - ncRNAs PREDITOS EM *Aeromonas* spp.

FONTE: O AUTOR, 2016

No quadro 3 contém os ncRNAs regulatórios preditos e em quais espécies de *Aeromonas* spp. foram identificados. Observa-se que somente alguns ncRNAs estão presentes em todas as espécies (Quadro 3A) enquanto outros estão presentes só em algumas delas (Quadro 3B). Existem ainda ncRNAs que são exclusivos de algumas espécies (Quadro 3C).

QUADRO 3 - LISTA DE ncRNAs REGULATÓRIOS ENCONTRADOS EM CADA ESPÉCIE DE *Aeromonas* spp.

1A															
	C-di-gmp-I	CrisPRDR48	CspA	CsrB/C	HpnC0260	IsrJ	MicC/X	RsmX	SgrS	SpoT 42	SraA/el	SuhB	SX6	tPP	RyhB/ Eb
<i>A. veronii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>A. hydrophila</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>A. trota</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>A. caviae</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>A. veronii bv sobria</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1B													
	SX13	SX9	T44	RimP	SbrA	SX14	IsrR	PsRNA14	RsmY	RyeA	SX11	SX4	SX5
<i>A. veronii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
<i>A. hydrophila</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>A. trota</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>A. caviae</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>A. veronii bv sobria</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
Total	4	4	4	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2

1C																		
	CrisPRDR47	FasX	FinP	FsrA	GabT	GavB	GyrA	IsrK	SX12	PrrF	RprA	RpsB	RsaE	RseX	SiX30s1-4	SroB	TarB	Yfr1
<i>A. veronii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. hydrophila</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
<i>A. trota</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
<i>A. caviae</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. veronii bv sobria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Lista de ncRNAs regulatórios e os *riboswitches* presentes nas diferentes espécies de *Aeromonas* spp. 3A ncRNAs encontrados em todas as espécies, 3B ncRNAs encontrados em até quatro espécies e 3C ncRNAs exclusivos de uma única espécie. No genoma de *Aeromonas veronii bv sobria* foi encontrado duas cópias do ncRNA CsrB.

FONTE: O AUTOR, 2016

O CspA está envolvido em processos de homeostase e regulação da temperatura²⁷. O C-di-gmp-I é um ncRNA que precisa da chaperona Hfq para desempenhar suas funções de virulência, motilidade e formação de biofilme²⁸. O CrisPRDR é necessário para os mecanismos de proteção da bactéria, uma vez que ele atua expulsando os DNAs invasores da bactéria²⁹. O SpoT42 regula o metabolismo de hidratos de carbono, sua síntese é aumentada na presença de glucose e inibida na presença de AMP (adenosina mono fosfato)³⁰. O PrrF está envolvido em processos de homeostase do ferro³¹. O RprA é regulado pelo RpoS (em situação de *stress*), a sua regulação pelo RpoS impede o bloqueio do RBS junto com a Hfq³². O SgrS é um ncRNA que precisa da associação com a Hfq, ele auxilia a célula a se recuperar de situações de *stress*³³. O FasX regula negativamente a expressão da pilis e de proteínas de ligação da fibronectina na superfície celular bacteriana³⁴. O RsaE regula a expressão de várias enzimas envolvidas no metabolismo, através da ligação anti-sentido do mRNA alvo³⁵. O Yfr1 está relacionado com o crescimento bacteriano em situações de *stress*³⁶. O CsrB age como regulador negativo da biossíntese de glicogênio³⁷. Os SX4, SX5, SX6, SX9, SX11, SX12, SX13 e SX14 codificam fatores de virulência em *Xantomonas*, porém

sua função em *Aeromonas* spp. ainda é desconhecida³⁸. O MicC e o MicX³⁹ atuam reprimindo o mRNA alvo *ompC*. O SuhB atua *in cis* e sua função ainda não é bem esclarecida⁴⁰. O IstR inibe a tradução da toxina TTSB⁴¹. O SraA e SreL são análogos e atuam como reguladores da transcrição e sua síntese esta aumentada em concentrações elevadas de magnésio⁴². RsmX e RsmY atuam na formação do biofilme e motilidade⁴³.

O *riboswitch* tPP tem uma estrutura secundária conservada e se liga ao pirofosfato de tiamina e regula a expressão de seus genes através de uma variedade de mecanismos⁴⁴. tPP é a forma ativa de tiamina, uma coenzima essencial sintetizada por meio de acoplamento de pirimidina e tiazol em bactérias⁴⁵. O SbrA auxilia a bactéria a tolerar situações de stress⁴⁶. O RimP regula a proteína NUSA⁴⁷. O RseX é dependente de Hfq e regula o *ompA* e *ompC*⁴⁸. O FsrA regula a biodisponibilidade de ferro⁴⁹. O GyrA é um *cis-encoded* ncRNA envolvido no mecanismo de resistência ao antibiótico ciprofloxacina⁵⁰. O RpsB está relacionado com a regulação da temperatura⁵¹. O TarB inibe a expressão de toxinas e é co-regulador da proteína pilus⁵². O IsrK é um regulador transcricional e o RyhB e RyeB são reguladores do metabolismo do ferro⁵³.

Predição de alvos pela ferramenta TargetRNA2

Os alvos dos ncRNAs foram preditos pela ferramenta TargetRNA2. O número de alvos foi variável e foram considerados somente aqueles que apresentaram valor de energia mínima de pareamento de -8 (Quadro 4). Foram obtidos o nome do mRNA alvo e a posição das bases envolvidas no pareamento entre o mRNA e o ncRNA. O menor valor de energia mínima de hibridização foi de -8.31 do par CspA/FLGL (flagelina) e o maior valor de energia mínima de hibridização foi de -27.44 do par SX13/PNUC (*Nicotinamide riboside transporter*). A energia mínima de hibridização reflete o valor de energia necessária para desfazer o pareamento, por isso, quanto mais negativo o valor mais estável é o pareamento estabelecido entre o ncRNA e seu alvo⁵⁴. Como já observado em outras bactérias, alguns sítios de pareamento entre os ncRNAs e os mRNAs estão próximos ou sobrepostos ao RBS, uma sequência importante para o acoplamento do mRNA no ribossomo⁵⁵. Assim, a formação do par ncRNA/mRNA bloqueia o RBS e impede a síntese da proteína. Em *Aeromonas* spp. foram encontrados 12 ncRNAs regulatórios que hibridizam na

região do RBS com valor de energia mínima de hibridização variando de -10.53 para o par ncRNA FinP/FLIL e -20.07 para o par ncRNA SgrS/MAP (Quadro 5). Nota-se que para um mesmo ncRNA podem ser observados valores de energia mínima de hibridização diferentes para cada um de seus alvos. Entretanto, estes valores não diferem muito entre si.

QUADRO 4 - ncRNAs REGULATÓRIOS DE *Aeromonas* spp. E SEUS POSSÍVEIS ALVOS PREDIOS PELA FERRAMENTA TargetRNA2

ncRNA regulatório	mRNAs Alvos
FasX	<i>msrA, sapB, menB, ppC, gmaha-2, hola, luxR, ppiB, nadB, secC, hemK, nagC, tetR</i>
CrisPRDR	<i>cusA, rhIE, pyk-1, smpB, livH, flgB, fabA, fabG, mutT, imcF, dsbA, dapE</i> <i>fliS, mglC, treC, hola, cobD, murP, cyoE, cyaA, galU, sfsA, gltB, yipB, msbB</i>
SX13	<i>sprT, pneuC, radC, hlyU, putP, malt-1, yibP, secD, hslU, yehT, phnE, qacE, uniB</i> <i>flhF, eutE, rnfE, tetR, alsS, glnP, pepQ, apbE, nijf-1, aspC, apaG</i>
SroB	<i>mshA, lysR, hemY, hrpA, chew-2, hslU</i>
SpoT42	<i>lpxH, miaB, rpoH, radC, ccoS, glyQ, pepsY, cysN, deoA, nplC, dapa-2, atpE, nqrA, cyaA</i>
RprA	<i>yjdB, gspO, ruma-2, metN, kefA, yicE, lysR, ptsH, dapa-1, lpxD, fliA, gntR,</i> <i>pap2, secD-1, thiF, coaA, lesA, dppD, rpmC</i>
SgrS	<i>maP, treC, gmha-2, mazG, iada, srmB, sbccD, lpxH, creB, fkpB, bvgS, lysR, xdhb, yqbC,</i> <i>yqiA, luxR, lepA, pvcB, rpml, nolR</i>
t44	<i>dppD, pumP, araC, mscS, grpE, tehB, motY, kdpA, araB, folA, argG, cueR, sugE, lepA,</i> <i>kdkA, redF</i>
SX9	<i>fumC, hisD, mukB, torC, mmsa-2, cinA, gltB, tonb2, mutT, hmgA, pyrE, nudX</i>
CsrB	<i>sanA, hyfA, dinB, phnX, thiC, pap2, kdkA, nuoF, pheA, dnaX, dppD, treC, cysA, eutE,</i> <i>kdpC, trps-2, amrB, tonB, nupC, mshA, mutT, greA, parA, nudX, nudF, mipA,</i>
MicC	<i>uuP, rbsB, tpiA, mdhH, gntR, sprT, nlpD, recD, coaE, csgA</i>
FsaE	<i>chea-1, aspS, rplA, asd-2, dnaX, trps-1, hslO, rpsl, hutU, secY, lolD, ompR, asma</i>
CspA	<i>pepsY, fliK, hrfF, ftsA, ompR, gntR, thiQ, csgaB, ycjZ, finV, nrtC, flil, gloA, flgL</i>
FinP	<i>omlA, flil, fleQ, minC, rpsD</i>
RimP	<i>dinB, fbpC, pilQ, mdhH, glaA, greB, recR, gabT, phzF, cinA, minE, osmC, oppA, fadJ, panE, ilvE</i>

RNAs não codificadores regulatórios de importância para o trabalho e seus alvos preditos pela ferramenta TargetRNA2. Os ncRNAs foram escolhidos aleatoriamente para ilustrar quais são os seus alvos.

FONTE: O AUTOR, 2016

QUADRO 5 - ALVOS DOS ncRNAs E SUAS CARACTERÍSTICAS

ncRNA	ALVO	ENERGIA	LOCALIZAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
CRSIPRDR	FABG	-12,25	-4	10	3-quetooacil-ACT-redutase
	FNR	-10,91	-2	9	regulação de fumarato/ nitrato - regulador transcricional
SX13	MALT-1	-19,67	-19	1	repressor transcricional
	UNIB	-12,76	-9	9	biossíntese de ubiquinona
SGRS	MAP	-20,07	-11	8	metionina aminopeptidase
	TREC	-18,49	-6	9	alfa-fosfotrealose
	GMHA-2	-17,51	-10	11	fosfoheptose isomerase
SPOT42	LPXH	-12,21	-5	13	udp-2,3-diacilglucosamina hidrolase
	RPOH	-11,74	-12	3	fator sigma alternativo
RPR	DAPA-1	-10,81	-6	13	síntese de dihidropicolinato
T44	KDPA	-10,91	-7	12	transportador de potássio
SX9	FUNC	-15,04	-4	12	fumarato hidratase
	MUKB	-12,99	-4	10	proteína de divisão celular
CSRB	UDK	-15,6	-22	-2	uridina quinase
	NUOF	-12,79	-24	-5	NADH
	PHEA	-12,09	-6	10	?
MICC	RBSB	-13,24	-13	-4	transportador da D-ribose
FSAE	ASD-2	-10,97	-1	19	aspartato semialdeído desidrogenase
CSPA	FTSA	-12,99	-11	8	proteína de divisão celular
	THIQ	-10,78	-13	1	tiamina/ transportador de ATP
FINP	RPSD	-11,59	-5	9	proteína ribossomal
	FLIL	-10,53	-9	10	proteína flagelar basal
RIMP	GLDA	-13,12	-21	-3	glicerol desidrogenase
	RECR	-11,21	-15	5	proteína recombinante

O quadro ilustra e caracteriza o alvo do ncRNA, como: a função, a sua localização em relação ao códon de início da tradução AUG e a sua energia mínima de hibridização. Os alvos foram escolhidos de acordo com a sua energia e a sua localização (preferencialmente próximos ao RBS).

FONTE: O AUTOR, 2016

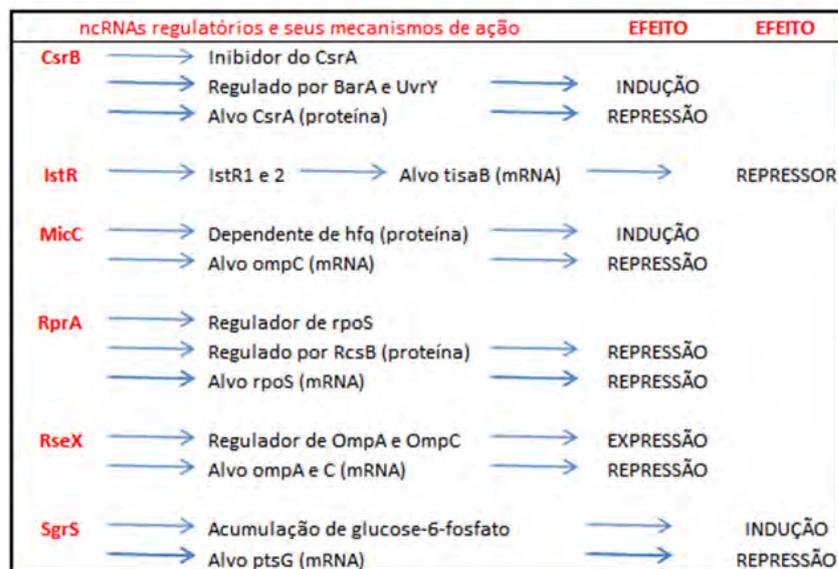
Os alvos dizem respeito a genes como *MSHA*, alvo do ncRNA SroB, que é responsável pela colonização da bactéria no organismo do hospedeiro⁵⁶. Genes responsáveis pelo sistema de secreção tipo III e IV, que dão o caráter de virulência as bactérias gram-negativas e que são alvos do ncRNA RimP. Genes responsáveis pela formação e rotação dos flagelos que permitem a bactéria motilidade e invasão no tecido hospedeiro são alvos dos ncRNAs FinP e CspA. Genes que auxiliam a bactéria na formação do biofilme, alvos do C-di-gmp-I⁵⁷. Genes como *CHEW* que estão envolvidos na transmissão de sinais sensoriais, alvos dos ncRNAs SroB e RsaE⁵⁸.

No geral os alvos de ncRNAs regulatórios identificados tem função de: proteína receptor de AMP cíclico, proteína de ligação de ácido nucléico, transportador aeróbico, absorção de ferro, proteínas de membrana, proteínas de adesão como *MSHA*, *FLP*, *PILI*, proteínas de motilidade como os *FLAGELOS*, riboenzimas que catalisam reações químicas e regulam genes em respostas a

concentração de determinados metabólitos como glucose-6-fosfato, proteínas de transmissão de sinais sensoriais, quimiotaxia, formação de biofilme, sistemas de secreção e produção de toxinas que favorecem os mecanismos de virulência da bactéria. Como exemplo temos o *PILQ*, responsável pelo sistema de secreção tipo III⁵⁹; o FLIL que é uma proteína flagelar basal⁶⁰; o MINC proteína septar⁶¹ e o CHEW-2 proteína quimiotática⁵⁷. O quadro 4 mostra como alguns dos ncRNAs regulatórios agem sob seus alvos.

Os ncRNAs induzem, reprimem ou degradam os seus alvos, no entanto alguns ncRNAs dependem de uma chaperona de RNA, nesse caso a proteína Hfq, para que a ligação com o mRNA alvo aconteça (Quadro 6). Os seus mecanismos de regulação variam, alguns são regulados por grupos de dois componentes como o CsrB, que é regulado pelo BarA-UvrY e age reprimindo a proteína CsrA, já o IstR reprime os mRNAs alvos, assim como o MicC, o RprA e o RseX. O ncRNA SgrS é regulado de acordo com a concentração de glucose-6-fosfato e atua reprimindo o seu mRNA alvo (Quadro 4). Alguns dos alvos dos ncRNAs são responsáveis por codificar fatores de virulência, esses fatores estão relacionados com a habilidade do organismo em causar doenças, e o conjunto desses fatores resulta em mecanismos de virulência (Quadro 7).

QUADRO 6 - ncRNAs REGULATÓRIOS DE *Aeromonas* spp. E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO



Exemplos de como os ncRNAs agem sobre seus alvos e como são regulados.

FONTE: O AUTOR, 2016

QUADRO 7 – FATORES DE VIRULÊNCIA ALVOS DE ncRNAs EM *Aeromonas* spp. E SEUS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

ncRNA	Fatores de virulência	Mecanismos de virulência
SroB	<i>mshA</i>	Colonização bacteriana no tecido hospedeiro
RimP	<i>pilQ</i>	Sistemas de secreção
FinP e CspA	<i>fliL, flgB, flgL e fliS</i>	Motilidade e invasão
SroB e RsaE	<i>cheW</i>	Transmissão de sinais sensoriais
FinP	<i>minC</i>	Formação de septos
SroB	<i>cheW-2</i>	Transmissão de sinais sensoriais
RseX	<i>ompA</i>	Proteínas de membrana
MicC	<i>ompC</i>	Proteínas de membrana
IstR	<i>tisA</i>	Toxina

Os RNAs não codificadores regulatórios que tem como alvos fatores de virulência, e quais mecanismos esses fatores desencadeiam.

FONTE: O AUTOR, 2016

Predição de ilhas genômicas e localização de alvos de ncRNAs em ilhas de patogenicidade

Os alvos dos ncRNAs regulatórios podem estar presentes em ilhas de patogenicidade no genoma de *Aeromonas* spp. Neste estudo foi investigada a presença de ilhas genômicas na espécie *A. veronii* B565 que é considerada uma das espécies mais virulentas⁶². Para predição de ilhas genômicas foram empregados 3 ferramentas: GIPSy, IslandView e ZIsland. Pela ferramenta GIPSy⁶³ foram preditas 8 ilhas putativas de patogenicidade, 6 ilhas putativas de resistência, 3 ilhas putativas de metabolismo e 8 ilhas putativas de simbiose (Quadro 8).

QUADRO 8 - PREDIÇÃO DE ILHAS GENÔMICAS EM *A. veronii* B565 – FERRAMENTA GIPSY

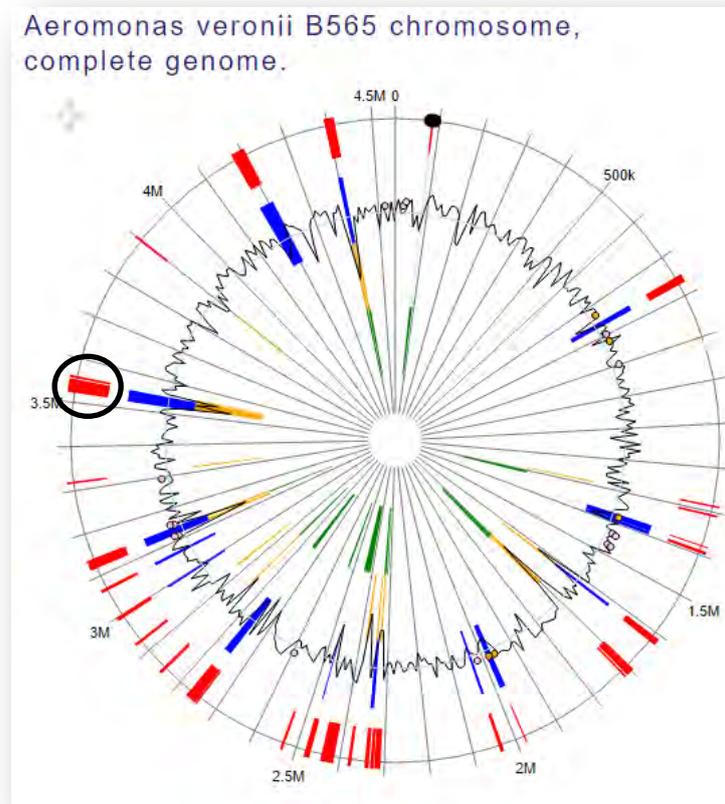
ILHAS	Desvio G+C	Desvio uso de códons	Fatores de virulência	Proteínas hipotéticas
Putative Pathogenicity Island 1	42%	57%	42%	14%
Putative Pathogenicity Island 2	0%	33%	50%	33%
Putative Pathogenicity Island 3	69%	78%	78%	21%
Putative Pathogenicity Island 4	16%	30%	64%	38%
Putative Pathogenicity Island 5	18%	90%	63%	27%
Putative Pathogenicity Island 6	4%	8%	40%	40%
Putative Pathogenicity Island 7	57%	71%	50%	21%
Putative Pathogenicity Island 8	33%	55%	55%	33%
Putative Resistance Island 1	25%	25%	25%	25%
Putative Resistance Island 2	69%	78%	13%	21%
Putative Resistance Island 3	14%	14%	14%	42%
Putative Resistance Island 4	4%	8%	12%	40%
Putative Resistance Island 5	37%	12%	37%	37%
Putative Resistance Island 6	33%	55%	11%	33%
Putative Metabolic Island 1	42%	57%	57%	14%
Putative Metabolic Island 2	78%	78%	57%	21%
Putative Metabolic Island 3	33%	55%	44%	33%
Putative Symbiotic Island 1	0%	33%	16%	33%
Putative Symbiotic Island 2	0%	10%	30%	30%
Putative Symbiotic Island 3	25%	25%	25%	25%
Putative Symbiotic Island 4	69%	78%	21%	21%
Putative Symbiotic Island 5	18%	90%	18%	27%
Putative Symbiotic Island 6	4%	8%	40%	40%
Putative Symbiotic Island 7	37%	12%	25%	37%
Putative Symbiotic Island 8	33%	55%	22%	33%

Ilhas genômicas preditas pela ferramenta GIPSY, que mede uso de códons e o desvio do conteúdo GC da ilha em relação ao genoma, assim como os fatores de virulência em ilhas de patogenicidade.

FONTE: O AUTOR, 2016

Pela ferramenta IslandView⁶⁴ foi predita a presença e a posição de ilhas genômicas no genoma circular de *Aeromonas veronii* B565 (Figura 7)

FIGURA 7 - GENOMA CIRCULAR DE *A. veronii* B565, MOSTRANDO PROVÁVEIS REGIÕES DE ILHAS GENÔMICAS



Os retângulos de diferentes cores, como o circulado na imagem, representam a localização dos genes relacionados a diferentes funções, como metabolismo, virulência e resistência. As regiões em verde são resultado da ferramenta auxiliar IslandPick. As regiões em azul são resultado da ferramenta auxiliar IslandPath-Dimob e nelas estão presentes proteínas flagelares e proteínas de membrana. As regiões em amarelo são resultado da ferramenta auxiliar SIGI-HMM e nelas encontramos proteínas de pílus, flagelares e quimiotáticas. Os círculos de cor rosa representam fatores de virulência e os círculos em laranja representam genes associados a outros patógenos como *Xantomonas* spp.

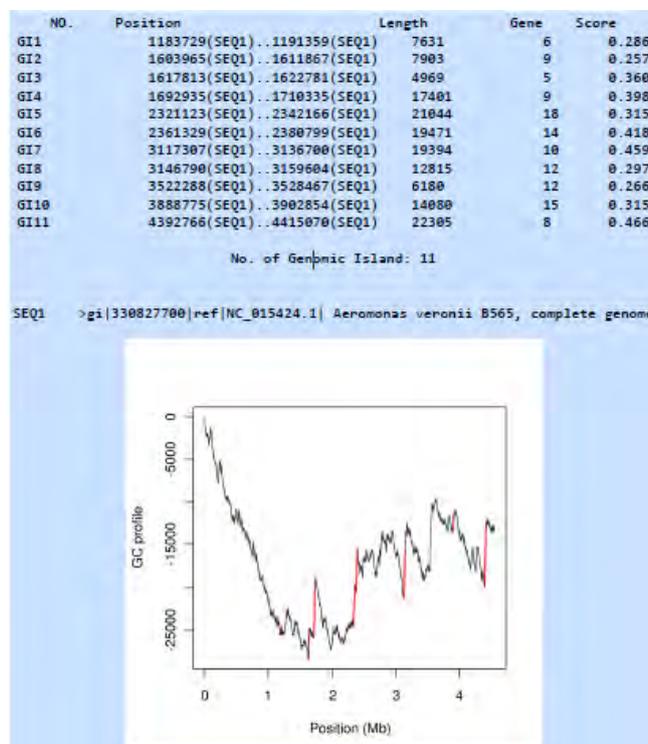
FONTE: ISLANDVIEW, 2016

No mapa, as regiões vermelhas são ilhas genômicas com alto grau de confiabilidade uma vez que foram preditas por mais de uma ferramenta computacional⁶⁴. Dentre os genes componentes das ilhas preditas foram encontrados o *lysR* que codifica regulador transcricional⁶⁵, o *cheY* que codifica uma proteína de membrana⁶⁶, o *bvgS* que codifica um fator de virulência⁶⁷ e o *rumA* cujo produto ainda é desconhecido⁶⁸. Esses mRNAs são alvos dos ncRNAs SroB e RprA respectivamente. Além disso, foram identificados dois genes codificadores de

proteínas flagelares *flgN* e *motY*, que foram preditos como sendo alvos do ncRNA SgrS.

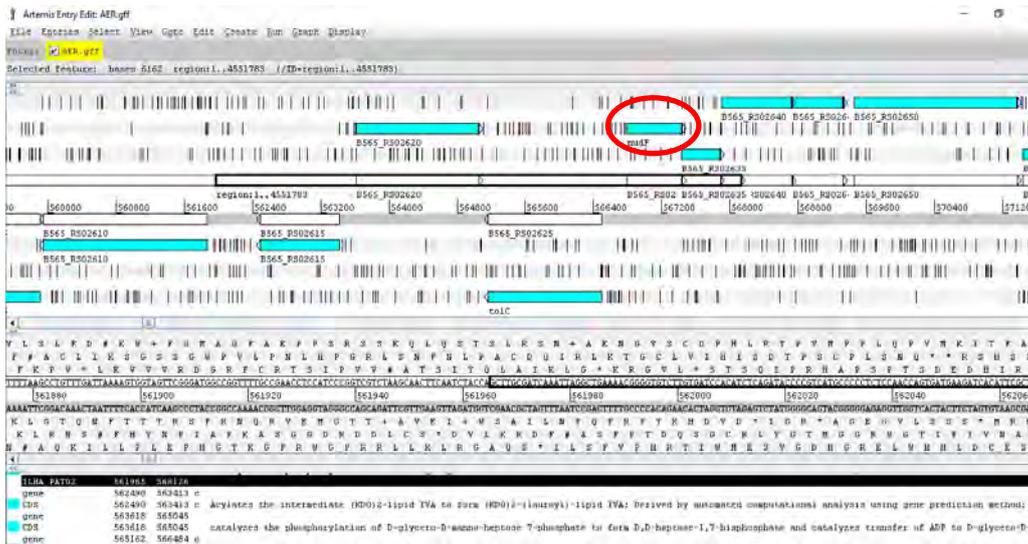
A ferramenta ZIsland⁶⁹ também foi empregado na predição de ilha de patogenicidade em *A. veronii* B565 (Figura 8). As ilhas podem ser identificadas através do desvio do uso de códons e da quantidade de fatores de virulência presentes em ilhas de patogenicidade, e também podem ser preditas através da variação do conteúdo GC. Como resultado obtém-se um gráfico mostrando os picos de GC%⁶⁹ (Figura 8). Foram preditas 11 ilhas genômicas (regiões vermelhas do gráfico) sem, no entanto, distinção entre elas. O gene *nudF* está nesta ilha e seu mRNA é alvo predito do ncRNA CsrB (Figura 9). O gene *nudF* codifica uma ADP-ribose pirofosfatase que regula negativamente a síntese do glicogênio em *E. coli*⁷⁰. Ressalta-se que no genoma de *A. veronii* B565 foram encontradas 2 cópias do gene codificador do ncRNA CsrB, anotadas como CsrB1, CsrB2, que apresentam 79% de similaridade.

FIGURA 8 - ILHAS GENÔMICAS PREDITAS PELA FERRAMENTA ZISLAND EM *A. veronii* B565



O gráfico mostra regiões putativas de ilhas genômicas, através da variação do conteúdo GC. Ele informa o número de ilhas preditas, a localização, a quantidade de genes e o score.

FONTE: ZISLAND, 2016

FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO DO GENE *nudF* EM ILHA GENÔMICA PREDITA EM *A. veronii* B565

O gene *nudF* (circulado em vermelho) está presente em uma ilha genômica de *A. veronii* B565 predita pela ferramenta ZIsland. Ele está co-localizado com o gene *tolC* e mais 4 genes ainda desconhecidos.

FONTE: CAPTURA DE TELA, ARTEMIS, 2016

Estruturas secundárias dos ncRNAs

Os ncRNAs podem ter suas estruturas secundárias preditas pela ferramenta RNAfold⁷¹, disponível em versão web que prevê estruturas secundárias de seqüências de DNA ou RNA de cadeia simples. Neste trabalho foram preditas as estruturas secundárias dos ncRNAs 6S, PrrB_RsmZ, CsrB1 e CsrB2 de *A. veronii* bv *sobria*. Uma vez que foram esses ncRNAs que apresentaram expressão diferencial na presença de desoxicolato de sódio. (vide próximo item).

A estrutura secundária do 6S em *Aeromonas* spp. tem alterações estruturais em relação a estrutura secundária do 6S em *E. coli* (Figura 10). A estrutura secundária do 6S consiste numa região central caracterizada por uma dobra interna de cadeia simples, que é seguida de uma dupla cadeia longa e irregular, descontinuada por pequenas dobras⁷².

FIGURA 10 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO ncRNA 6S de *A. veronii* bv *sobria* e de *E. coli*

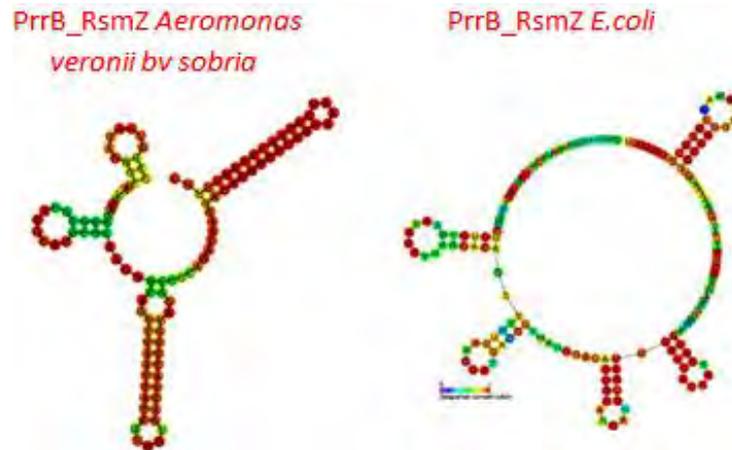


As regiões com diferentes tons de coloração mostram o grau de conservação do ncRNA, variando de 0 (roxo) a 1 (vermelho). As estruturas secundárias foram obtidas pela ferramenta RNAfold.

FONTE: O AUTOR, 2016

Em *E. coli* o ncRNA Prrb_RsmZ possui uma estrutura secundária complexa apresentando prováveis múltiplos laços de tronco com as sequências consenso posicionadas predominantemente nas regiões de cadeia simples nas extremidades dos laços-tronco. Esta estrutura foi dita semelhante aos ncRNAs reguladores CsrB e RsmB, sugerindo que este ncRNA também interagisse com uma proteína semelhante a CsrA em *E. coli*⁷³. Novamente, a estrutura secundária deste ncRNA em *Aeromonas veronii* bv *sobria* tem uma grande mudança estrutural quando comparada com a estrutura secundária deste ncRNA em *E. coli*, embora se observem regiões preditas como conservadas pelo RNAfold (Figura 11).

FIGURA 11 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO ncRNA CsrB DE *A. veronii* bv *sobria* e *E. coli*

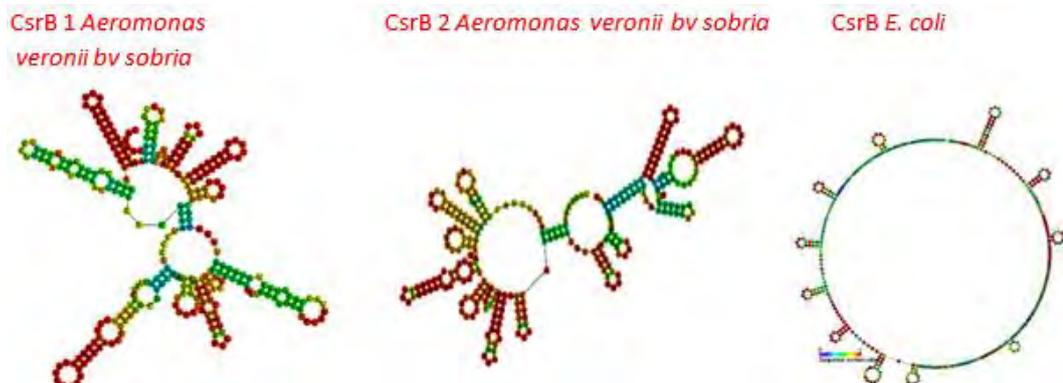


As regiões com diferentes tons de coloração mostram o grau de conservação do ncRNA, variando de 0 (roxo) a 1 (vermelho). As estruturas secundárias foram obtidas pela ferramenta RNAfold.

FONTE: O AUTOR, 2016

Os ncRNAs CsrB1 e CrcB2 de *A. veronii* bv *sobria* apresentam estruturas secundárias semelhantes, mas diferentes do ncRNA CsrB de *E. coli* (Figura 12). O ncRNA CsrB de *E. coli* pode ligar cerca de 9 a 10 dímeros da proteína CsrA uma vez que possui até 22 motivos GGA expostos nas alças da estrutura secundária (Figura 12). Enquanto CsrB1 possui 3 motivos GGA, o CsrB2 possui 22 motivos e isso pode ser um indício de que o CsrB2 seja mais eficiente na regulação exercida sobre CsrA. O sistema regulatório CsrA/CsrB tem um efeito regulador negativo sobre a síntese de glicogênio, gliconeogênese e catabolismo de glicogênio e um efeito regulador positivo na glicólise⁷⁴.

FIGURA 12 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS ncRNAs CsrB1 e CsrB2 de *A. veronii* bv *sobria* e CsrB de *E. coli*



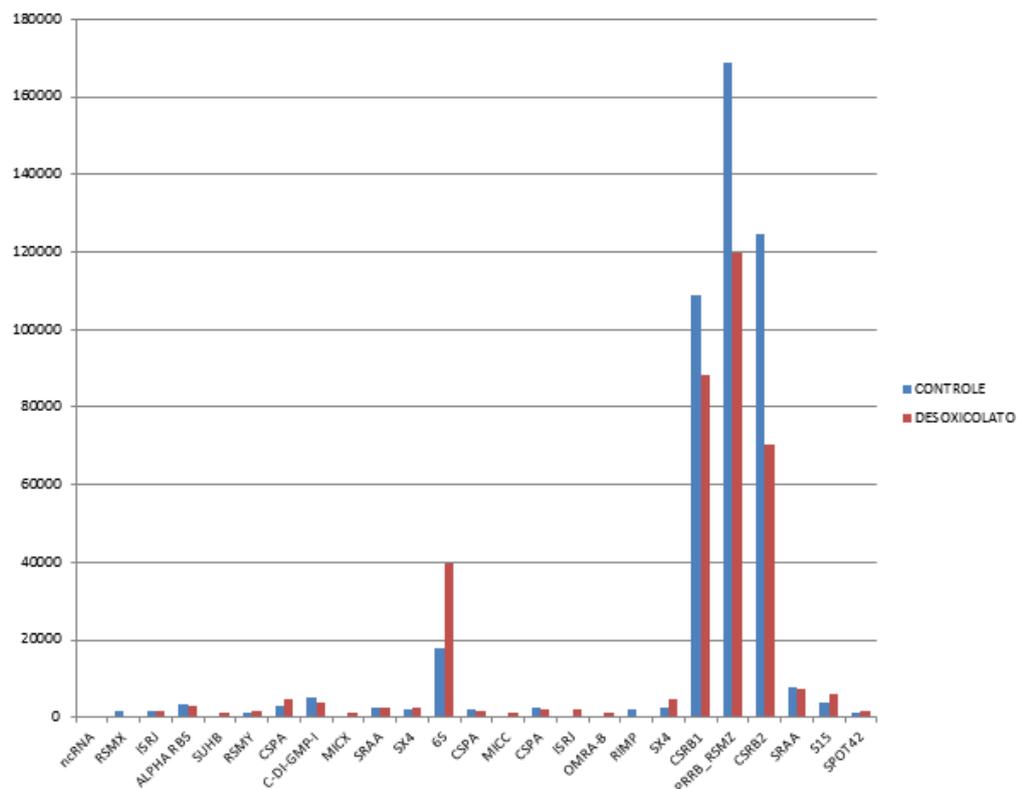
As áreas com diferentes tons de coloração mostram o grau de conservação do ncRNA, variando de 0 (roxo) a 1 (vermelho). As estruturas secundárias foram obtidas pela ferramenta RNAfold.

FONTE: O AUTOR, 2016

Perfil de expressão dos ncRNAs em *Aeromonas veronii* bv *sobria* 312M

A expressão diferencial de alguns ncRNAs regulatórios preditos para *A. veronii* bv *sobria* 312M foi confirmada através do sequenciamento de RNA obtido de células cultivadas em meio BHI adicionado ou não de desoxicolato de sódio a 0,1% e alguns ncRNAs apresentaram expressão diferencial. A expressão do ncRNA 6S aumentou em 200% enquanto a expressão dos ncRNAs CsrB1, PrrB_RsmZ e CsrB2 diminuiu em 81%, 23% e 56% respectivamente (Figura 13).

FIGURA 13 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS ncRNAs EM *A. veronii* bv *sobria* 312M



O gráfico mostra os valores de expressão dos ncRNAs em RPKM (eixo y) e os picos de expressão dos ncRNAs (eixo x). Somente valores iguais ou maiores que 1000 RPKM foram considerados valores de expressão. As bactérias foram cultivadas em meio BHI contendo ou não desoxicolato de sódio 0,1%.

FONTE: O AUTOR, 2016

Os outros ncRNAs preditos em *A. veronii* bv *sobria* 312M foram considerados como sendo expresso na condição controle uma vez que seus valores de expressão em RPKM foram superiores a 1000 RPKM, no entanto a presença do desoxicolato de sódio não interferiu na sua expressão (Figura 13).

DISCUSSÃO

RNAs não codificadores foram preditos em bactérias do gênero *Aeromonas* spp. Foram encontrados 231 ncRNAs candidatos, sendo a maior parte (175) classificada como small RNAs e os demais divididos em 50 ncRNAs regulatórios e 6 *riboswitches*. Esses últimos, aparentemente desempenham algum papel regulatório relacionado à virulência. Alguns ncRNAs regulatórios são exclusivos de apenas algumas espécies de *Aeromonas* spp. o que pode estar relacionado com seu potencial de virulência.

Os ncRNAs regulatórios foram identificados como participantes de diferentes funções fisiológicas como virulência e patogenicidade. Atuam regulando a formação de biofilme, para que a bactéria consiga sobreviver em ambientes de concorrência mútua (C-di-gmp-I *riboswitch*), formação de flagelos que são utilizados para locomoção, aderência e invasão no tecido do hospedeiro (RsmX, RsmY e FasX). Através da interação ncRNA/mRNA ou ncRNA/proteína, regulam a síntese ou função de fatores de virulência, como o *mshA* e os componentes dos sistemas de secreção tipo III, IV e VI, responsáveis pela colonização do tecido hospedeiro (SroB e RimP). Estão envolvidos também na regulação da síntese de proteínas de membrana e de flagelos (RsaE) e na regulação positiva ou negativa do metabolismo de carboidratos, ferro e magnésio (CspA e SpoT42).

Alguns dos ncRNAs foram preditos como exclusivos de algumas espécies, essa exclusividade se concentrou em 3 espécies; *A. hydrophila*, onde foram preditos 6 ncRNAs exclusivos entre eles o CrisPRDR47; *A. trota*, onde foram preditos 8 ncRNAs exclusivos, entre eles o GyrA, responsável pela resistência a antibióticos e *A. caviae*, onde foram preditos 3 ncRNAs exclusivos, entre eles, reguladores transcricionais como o RprA e o IsrK. Não se sabe ao certo o motivo dessa exclusividade de determinados ncRNAs.

A maioria dos ncRNAs regulatórios analisados atuam *in trans*, como o ncRNA MicX que parecia com mRNA *nudF*, responsável por codificar proteínas de membrana e o ncRNA SX4 que parecia com mRNA *recR*, um regulador transcricional. O ncRNA SuhB predito para *Aeromonas* spp. já foi identificado em α -Proteobacterias⁷⁵ e foi considerado um provável ncRNA que atua *in cis*, mas sem função regulatória estabelecida. O mini-YKKC foi predito em todas as espécies de *Aeromonas* e é considerado um *riboswitch* sensor de guanidina, amplamente distribuído em

bactérias, associado com genes de bombas de efluxo para a resistência a drogas e de transportadores ABC (ATP-binding cassette)⁷⁶.

Os ncRNAs MicC e RprA são dependentes da proteína chaperona de RNA Hfq para desempenhar sua função. Em *E. coli*, o MicC foi identificado como um repressor da síntese da porina OmpC, através da formação do par MicC/*ompC*mRNA e consequente bloqueio da região próxima ao códon de início de tradução⁷⁷. Em *Salmonella entérica* o RprA ativa a tradução do mRNA *rpoS*, que codifica o fator sigma alternativo σ^S ⁷⁸. Ao parear de forma antisense com o mRNA *rpoS* abre a região 5'UTR, permitindo o início da tradução.

O ncRNA CsrB compõe o sistema de regulação de estoque de carbono e sua expressão é ativada pelo sistema de dois componentes BarA/UvrY⁷⁹. É interessante ressaltar que a *A. veronii* bv *sobria* 312M apresenta duas cópias do ncRNA CsrB em seu genoma, com elevado grau de conservação (79%) mas, que tanto na ausência como na presença de desoxicolato, apresentaram diferentes níveis de expressão. Como já exposto, o CsrB2 possui 22 motivos GGA que são possíveis sítios de interação para dímeros CsrA e isso pode ser considerado um indício de que o CsrB2 seja mais eficiente na regulação do metabolismo do carbono em *A. veronii* bv *sobria* 312M. Na presença de desoxicolato de sódio foi observada uma redução da expressão do CsrB2 de 56% enquanto que para o CsrB1 houve uma redução de 81%. Percebe-se então que o CsrB2 ainda pode estar exercendo um efeito regulatório sobre o metabolismo do carbono no início da fase estacionária (Figura 8).

Outro ncRNA expresso diferencialmente em *A. veronii* bv *sobria* 312M foi o PrrB_RsmZ. Esse ncRNA, por sua vez, também é regulado por um sistema de transdução de sinal de dois componentes, o GacS-GacA, que controla a produção de metabólitos secundários e enzimas extracelulares envolvidos na patogenicidade⁸⁰. Em *E. coli*, a semelhança de estrutura secundária entre PrrB_RsmZ e CsrB e a presença de três sequências GGA nas alças, levou Aarons e colaboradores (2000) a sugerirem que este RNA pode interagir com uma proteína semelhante a CsrA. Em *A. veronni* bv *sobria* 312M se observou queda da expressão do ncPrrB_RsmZ (23%) na presença de desoxicolato de sódio (Figura 8). Esse ncRNA apresenta uma sequência GGA em uma das quatro alças e esse poderia ser um fator regulatório na tradução do mRNA *csrA*, embora não tenhamos evidência da ocorrência da formação do par regulatório ncPrrB_RsmZ /mRNACsrA.

O ncSgrS é ativado pelo ncSgrR em *E. coli* durante o *stress* de glicose fosfato e está correlacionada com o acúmulo intracelular de glicose-6-fosfato⁸¹. O SgrS ajuda as células a recuperar-se através da regulação negativa da tradução do mRNA *ptsG*, um componente do sistema transportador de fosfotransferase glicose específico⁸². A regulação se dá por emparelhamento de bases ncRNA/mRNA, dependente de Hfq, causando a degradação do mRNA pela RNaseE. A incapacidade das células que expressam *sgrS* para traduzir novos transportadores de glicose leva a menor absorção de glicose e níveis reduzidos de glicose-6-fosfato intracelular. SgrS é um ncRNA incomum, que também codifica um peptídeo funcional de 43 aminoácidos, o SgrT⁸³. Este peptídeo localiza-se na membrana impedindo atividade do transportador de glicose⁸⁴. Em *A. veronii* bv *sobria* 312M não foi observada expressão do ncRNA SgrS.

Finalmente, em relação ao 6S RNA, é comum observar o aumento 200% da expressão desse ncRNA na fase estacionária, quando as células reduzem sua atividade metabólica e há a regulação da transcrição pela formação do par 6S/RNA polimerase¹⁹. Em *A. veronii* bv *sobria* 312M, uma vez o RNA foi coletado de uma cultura de células com D.O._{600 nm} = 1 (Figura 1 Material Suplementar) esperava-se expressão já acentuada do ncRNA 6S em ambas as condições ensaiadas, uma vez que ele pode estar relacionado com o fator sigma S, responsável pela aumento da expressão do 6S RNA em situações de *stress*. Aparentemente, as células cultivadas na presença do desoxicolato estão regulando mais intensamente a transcrição, mesmo no início da fase estacionária, uma vez que houve aumento de duas vezes no nível de expressão desse RNA.

No gênero *Aeromonas*, utilizando a ferramenta TargetRNA2, foi possível obter diferentes números de alvos para ncRNA candidato analisado. A ferramenta fornece resultados de probabilidade de pareamento entre o ncRNA e o mRNA que cobre diferentes sequências de bases na região a montante ou a jusante do sitio de ligação do ribossomo. Durante a formação do par ncRNA/mRNA, as sequências alvo que estão sobrepostas no RBS tem a característica de bloquear este sítio, impedindo o acoplamento no ribossomo e conseqüentemente o processo de tradução. Nos casos em que o pareamento acontece em região afastada do RBS, não se descarta a possibilidade de um efeito regulatório, pois há casos em que a ligação do ncRNA ao seu alvo expõe o mRNA ao efeito de enzimas como a RNaseE. A análise computacional para a predição de alvos considera a energia

mínima de hibridização, independente da distância da sequência alvo em relação ao RBS²⁶. Em *Aeromonas* spp. foram considerados os alvos com a energia mínima de hibridização mais negativa e que estão sobrepostos no RBS, pois estes dois aspectos conferem um maior grau de confiabilidade que os alvos podem ser verdadeiros. A confirmação depende de análise experimental.

Para a predição de ilhas de patogenicidade, foram utilizados três ferramentas com metodologias diferentes, o GIPSY identificou oito ilhas de patogenicidade fundamentado em desvio do uso de códons, desvio do GC% e presença de fatores de virulência, o IslandView identificou ilhas de patogenicidade com base em genes e elementos funcionais e o uso de códons. Em uma das ilhas foram identificados o *lysR*, um regulador transcricional e fatores de virulência como proteínas de membrana (CHEY), o fator de virulência *bvgS*, o pilus FLP e proteínas flagelares do grupo motY. As análises feitas pela ferramenta ZIsland são embasadas em conteúdo GC, no entanto ele não distingue as ilhas genômicas preditas. Em uma das ilhas preditas identificamos o gene *nudF* cujo produto regula negativamente a síntese de glicogênio⁷⁰.

Os resultados deixam evidente que no gênero *Aeromonas* os ncRNAs estão envolvidos em processos regulatórios complexos, atuando sobre alvos, presentes ou não em ilhas genômicas e que podem estar envolvidos nos mais variados processos, que vão desde de regulação transcricional a regulação de fatores de virulência que implicam em mecanismos patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. **Family I. Aeromonadaceae**. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 2^a ed. New York: Springer, 2005;
- 2) FIGUEIRA, V.; VAZ-MOREIRA, I.; SILVA, M.; MANAIA, C.M. **Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants**. Water Research. 17: 5599 – 5611, 2011;
- 3) JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. **The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection**. Clinical Microbiology Reviews. 1: 35-73, 2010;
- 4) WHO. **New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. Part I**. Wkly Epidemiol Rec. 74: 98-101, 1999;
- 5) MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. **Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Pleisiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of Congruence with result of DNA-DNA hybridizations**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 3: 412 – 421, 1992;
- 6) VON GRAEVENITZ, A. **The role *Aeromonas* in diarrhea: a review**. Infection. 2: 59-64, 2007;
- 7) DIXON, B. **Natural Disaster Microbiology**. Microbe. 3: 312-313, 2008;
- 8) VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, J.; VARGAS, M.; SOLER, L., FIGUERAS, M. J.; GASCÓN, J. ***Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance**. Emerging Infectious Diseases. 9: 552 – 555, 2003;
- 9) HACKER, J. *et al.* **Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur in vivo and in vitro in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates**. Microb. Pathogen. 8: 213-225, 1990;
- 10) DUONG, F.; WICKNER, W. **The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling**. Embo J. 16: 4871-4879, 1997;
- 11) REMAUT, H.; WAKSMAN, G. **Structural biology of bacterial pathogenesis**. Curr Opin Struct Biol. 14: 161-170, 2004;
- 12) HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. **Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens**. Biochim. Biophys. 1694: 181-206, 2004;

- 13) CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. **Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells.** Trends Microbiol. 8: 354–360, 2004;
- 14) GEORG, J.; HESS, W. **Cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria.** Microbiol Mol. Biol. Rev. 2: 286–300, 2011;
- 15) PICHON, C.; FELDEN, B. **Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria.** Bioinformatics. 24: 2807-13, 2008;
- 16) SHARMA, C. M.; VOGEL, J. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. Biochem Biophys Res Commun. 3: 950-955, 2006;
- 17) WATERS, L. S.; STORZ, G. **Regulatory RNAs in bacteria.** Cell. 136: 615-628, 2009;
- 18) BREAKER, R. R. **Riboswitches and the RNA world.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 4, 2012;
- 19) TROTOCHAUD, A. E.; WASSARMAN, K. M. **6S RNA function enhances long-term cell survival.** J Bacteriol. 186:4978–4985, 2004;

STEUTEN, B.; WAGNER, R. **A conformational switch is responsible for the reversal of the 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in *Escherichia coli*.** Biol Chem. 393:1513-1522, 2012;
- 20) TOLEDO-ARANA, A.; REPOILA, F.; COSSART, P. **Small noncoding RNAs controlling pathogenesis.** Curr Opin Microbiol. 10: 182–188. 2007;
- 21) WASSARMAN, K. M.; STORZ, G. **6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity.** Cell. 101: 613-623, 2000;
- 22) Grupo de Ciências Biológicas do IST. **«Preparação de meios de cultura sólidos (agarizados)».** Consultado em agosto de 2015; meio de TSA;
- 23) FLORES, M.; D. WELCH. **Mycology: culture media.** Clinical microbiology procedures handbook, 1: 671-673, 1992;
- 24) ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. **High Pure RNA Isolation Kit.** Roche Applied Science 68298 Mannheim. 2008;
- 25) Ion Proton System for Next-Generation Sequencing. **Thermo Fisher Scientific,** 2017;
- 26) TJADEN B.; GOODWIN, S. S.; OPDYKE, J. A.; GUILLIER, M.; FU, D. X.; GOTTESMAN, S.; STORZ, G. **Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria.** Nucleic Acids. 9: 2791-802, 2006.

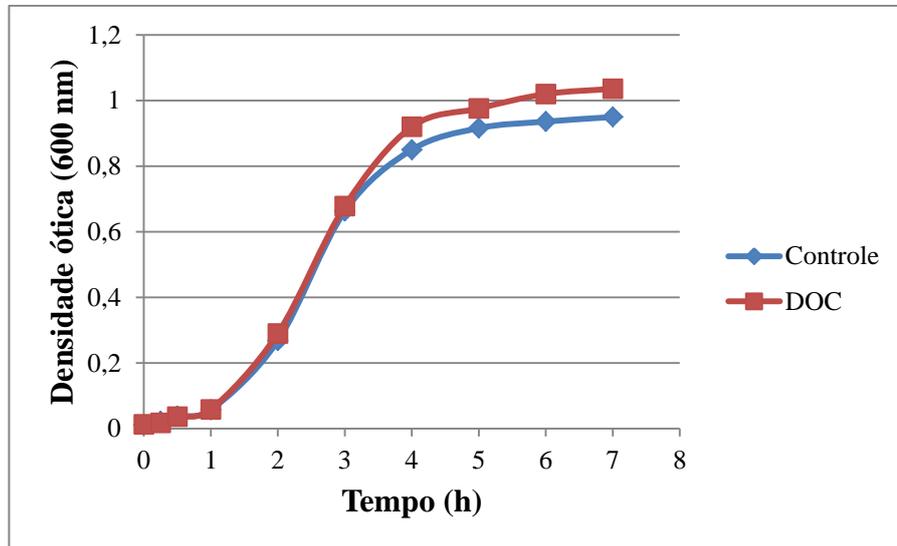
- 27) WANG, Z.; WENXIAO, L.; TONGLEI, W.; PENGFEI, B.; QINGMIN, W. **RNA-seq reveals the critical role of CspA in regulating *Brucella melitensis* metabolism and virulence.** Life Science research paper. 4981-86, 2015;
- 28) SMITH, K. D.; LIPCHOCK, S. V.; STROBEL, S. A. **Structural and biochemical characterization of linear dinucleotide analogs bound to the c-di-GMP-I aptamer.** Biochemistry. 1: 425–432, 2012;
- 29) HOOTON *et al.* **The Bacteriophage Carrier State of *Campylobacter jejuni* Features Changes in Host Non-coding RNA and the Acquisition of New Host-derived CRISPR Spacer Sequences.** Frontiers in Microbiology. 7: 355, 2016;
- 30) MOLLER, T.; FRANCH, T.; UDESEN, C.; GERDES, K.; VALENTIN-HANSEN, P. **Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon.** Genes Dev. 16: 1696–1706, 2002;
- 31) REINHART *et al.* **The *prfF*-Encoded Small Regulatory RNAs Are Required for Iron Homeostasis and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.** Infect Immun. 3: 863-875, 2015;
- 32) PAPPENFORTH *et al.* **Small RNA-based feedforward loop with AND-gate logic regulates extrachromosomal DNA transfer in Salmonella.** Proc Natl Acad Sci U S A. 34: 4772-4781, 2015;
- 33) BOBROVSKYY, M.; VANDERPOOL, C. K. **The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria.** Front Cell Infect Microbiol. 4:61, 2014;
- 34) DANGER *et al.* **The FasX Small Regulatory RNA Negatively Regulates the Expression of Two Fibronectin-Binding Proteins in Group A *Streptococcus*.** J. of Bacteriol. 197: 3720-3730, 2015;
- 35) DURAND *et al.* **A Nitric Oxide Regulated Small RNA Controls Expression of Genes Involved in Redox Homeostasis in *Bacillus subtilis*.** PLoS Genet. 11: 2, 2015;
- 36) RICHTER *et al.* **Seed-based INTARNA prediction combined with GFP-reporter system identifies mRNA targets of the small RNA Yfr1.** Bioinformatics discovery. 26: 1–5, 2009;
- 37) SUZUKI *et al.* **Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY Systems of *Escherichia coli*.** J. of Bacteriol. 184: 5130–5140, 2002;
- 38) ASTUA-MONGE, G. *et al.* **Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis*.** J. of Bacteriol. 187: 1201-1205, 2005.
- 39) GÖRKE, B.; VOGEL, J. **Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars.** Genes. 22: 2914-2925, 2008;

- 40) DEL VAL *et al.* **A survey of sRNA families in α -proteobacteria.** RNA Biology. 9: 1–11, 2012;
- 41) ORTEGA, A. D.; GONZALO-ASENSIO, J.; PORTILHO, F. G. **Dynamics of Salmonella small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells.** RNA Biology. 9: 469-488, 2012;
- 42) OVERGAARD, M.; KALLIPOLITIS, B.; VALENTIN-HANSEN, P. **Modulating the bacterial surface with small RNAs a new twist on PhoP/Q-mediated lipopolysaccharide modification.** Mol Microbiol. 74: 1289-1294, 2009;
- 43) MOLL, S.; SCHNEIDER, D. J.; STODGHILL, P.; MYERS, C. R.; CARTINHO, S. W.; FILIATRAULT, M. J. **Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv.** RNA Biol. 7: 1–9, 2010;
- 44) NABOKINA, S. M.; RAMOS, M. B.; SAID, H. M. **Mechanism(S) Involved in the Colon-Specific Expression of the Thiamine Pyrophosphate (Tpp) Transporter.** PLoS ONE. 11, 2016;
- 45) EDWARDS, T. E.; FERRÉ-D'AMARÉ, A. R. **Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition.** Structure. 14: 1459–1468, 2006;
- 46) REPOILA, F.; DARFEUILLE, F. **Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects.** Biol Cell. 101: 117-131, 2009;
- 47) NAVILLE, M.; GAUTHERET, D. **Premature terminator analysis sheds light on a hidden world of bacterial transcriptional attenuation.** Genome Biology. 11: 97, 2010;
- 48) PAPPENFORTH, K.; PFEIFFER, V.; LUCCHINI, S.; SONAWANE, A.; HINTON, J. C.; VOGEL, J. **Systematic deletion of Salmonella small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis.** Mol Microbiol. 68: 890-906, 2008;
- 49) SMALDONE *et al.* **The FsrA sRNA and FbpB Protein Mediate the Iron-Dependent Induction of the *Bacillus subtilis* LutABC Iron-Sulfur-Containing Oxidases.** J. of bacteriol. 194: 2586 –2593, 2012;
- 50) WEINBERG *et al.* **Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea and their metagenomes.** Genome Biol. 11: 31, 2010;
- 51) ASEEV, L. V.; LEVANDOVSKAYA, A. A.; TCHUFISTOVA, L. S.; SKAPTSOVA, N. V.; BONI, I. V. **A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the *rpsB*-*tsf* expression in vivo.** RNA. 14: 1882–1894, 2008;

- 52) PADALON-BRAUCH *et al.* **Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence.** *Nucleic Acids Research*. 36: 1913–1927, 2008;
- 53) MURPHY, E. R.; PAYNE, S. M. **RyhB, an Iron-Responsive Small RNA Molecule, Regulates *Shigella dysenteriae* Virulence.** *Infect Immun*. 75: 3470–3477, 2007;
- 54) TAFER, H.; HOFACKER, I. L. **RNAplex: a fast tool for RNA-RNA interaction search.** *Bioinformatics*. 24:2657–2663, 2008;
- 55) ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica.** 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014;
- 56) BUCHMEIER, N.; FAHEY, R. C. **The *mshA* gene encoding the glycosyltransferase of mycothiol biosynthesis is essential in *Mycobacterium tuberculosis* Erdman.** *FEMS Microbiol Lett*. 264: 74-79, 2006;
- 57) OLIVA, G.; SAHR, T.; BUCHRIESER, C. **Small RNAs, 5_ UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence.** *FEMS Microbiology Reviews*. 331–349, 2015;
- 58) PITTMAN, M. S.; GOODWIN, M.; KELLY, D. **Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation.** *J. Microbiology*. 2001;
- 59) MARTIN, P. R.; HOBBS, M.; FREE, P. D.; JESKE, Y.; MATTICK, J. S. **Characterization of pilQ, a new gene required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol*. 4: 857-68, 1993;
- 60) RAHA, M.; SOCKETT, H.; MACNAB, R. M. **Characterization of the *fliL* gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.** *J Bacteriol*. 8: 2308-2311, 1994;
- 61) HUANG, J. *et al.* **Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division.** *J. Bacteriol*. 178: 5080-5085, 1996;
- 62) GHENGHESH, K. E. *et al.* ***Aeromonas* associated infections in developing countries.** *J. developing counties*. 2: 81-98, 2008;
- 63) SOARES, S. *et al.* **GIPSy: Genomic island prediction software.** *Journal of Biotechnology*, 2015;
- 64) LANGUILLE, M.; HSIAO, W.; BRINKMAN, F. **Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach.** *BMC Bioinformatics*, 2008;

- 65) MADDOCKS, S. E.; OYSTON, P. C. **Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins.** *Microbiology*. 12: 3609-3623, 2008;
- 66) KUO, S. C.; KOSHLAND, D. E. Jr. **Roles of cheY and cheZ gene products in controlling flagellar rotation in bacterial chemotaxis of *Escherichia coli*.** *J Bacteriol*. 169: 1307–1314, 1987;
- 67) MILLER, J. F.; JOHNSON, S. A.; BLACK, W. J.; BEATTIE, D. T.; MEKALANOS, J. J.; FALKOW, S. **Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* bvgS gene.** *J. Bacteriol*, 1992;
- 68) RAMARE, F.; NICOLI, J.; DABARD, J.; CORRING, T.; LADIRE, M.; GUEUGNEAU, A. M.; RAIBAUD, P. **Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and in vitro.** *Microbiol*. 59: 2876–2883, 1993;
- 69) WEI, W. *et al.* **Zisland Explorer: detect genomic islands by combining homogeneity and heterogeneity properties.** *Briefings in Bioinformatics*. 1–10, 2016;
- 70) MORENO-BRUNA, B.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, F. J.; BASTARRICA-BERASATEGUI, A.; ZANDUETA-CRIADO, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.; LASA, I.; AKAZAWA, T.; POZUETA-ROMERO, J. **Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 8128–8132, 2001;
- 71) LORENZ, R. *et al.* **ViennaRNA package 2.0. Algorithms Mol. Biol.**, 6, 26. Mathews, D. H. *et al.* (2004) **Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure.** *PNAS*. 101: 7287–7292, 2011;
- 72) TROTOCHAUD, A. E.; WASSARMAN, K. M. **A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription.** *Nat Struct Mol Biol*. 12: 313-319, 2005;
- 73) AARONS, S.; ABBAS, A.; ADAMS, C.; FENTON, A.; O'GARA, F. **Um RNA regulador (PrrB RNA) modula a expressão dos genes do metabolito secundário em *Pseudomonas fluorescens* F113.** *J. Bacteriol*. 182: 3913-3919, 2000;
- 74) LIU, M. Y.; GUI, G.; WEI, B, *et al.* **A molécula de ARN CsrB se liga à proteína reguladora global CsrA e antagoniza sua atividade em *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem*. 272: 17502-17510, 1997;
- 75) DEL VAL, C.; ROMERO-ZALIZ, R.; TORRES-QUESADA, O.; PEREGRINA, A.; TORO, N.; JIMÉNEZ-ZURDO, J. I. **A survey of sRNA families in α proteobacteria.** *RNA Biol*. 9: 119–129, 2012;

- 76) BATTAGLIA, *et al.* **Structural bases for guanidine sensing by the ykcc Family os riboswitches.** RNA. 23: 578-585, 2017;
- 77) CHEN, S.; ZHANG, A.; BLYN, L. B.; STORZ, G. **MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. 186: 6689–6697, 2004;
- 78) PAPPENFORTH, K.; ESPINOSA, E.; CASADESÚS, J.; VOGEL, J. **Small RNA-based feedforward loop with AND-gate logic regulates extrachromosomal DNA transfer in *Salmonella*.** Proc Natl Acad Sci USA. 112: 4772-4781, 2015;
- 79) CAMACHO, M. I.; ALVAREZ, A. F.; CHAVEZ, R. G.; ROMEO, T.; MERINO, E.; GEORGELLIS D. **Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system.** J Bacteriol. 197: 983-991, 2015;
- 80) HEEB, S.; HAAS, D. **Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria.** Mol Plant Microbe Interact. 14: 1351-63, 2001;
- 81) VANDERPOOL, C. K.; GOTTESMAN, S. **The Novel Transcription Factor SgrR Coordinates the Response to Glucose-Phosphate Stress.** J. Bact. 189: 2238–2248, 2007;
- 82) RICE, J. B.; VANDERPOOL, C. K. **The small RNA SgrS controls sugar-phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes.** Nucleic Acids Res. 39: 3806–3819, 2011;
- 83) PLUMBRIDGE, J. **Expression of ptsG, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose.** Mol Microbiol. 4: 1053-1063, 1998;
- 84) LLOYD, C. R., PARK, S.; FEI, J.; VANDERPOOL, C. K. **The small protein SgrT controls transport activity of the glucose-specific phosphotransferase system.** J. Bacteriol. 199: 7, 2017.

MATERIAL SUPLEMENTAR**FIGURA 1 - CURVA DE CRESCIMENTO de *A. veronii* bv *sobria* NA AUSENCIA OU PRESENÇA DE DESOXICOLATO**

Cem microlitros de uma cultura de *A. veronii* bv *sobria* cultivada em meio BHI, overnight a $35\pm 1^\circ\text{C}$, foram utilizados como inóculo em dois frascos contendo meio BHI. Quando as culturas atingiram $\text{D.O.}_{600\text{ nm}} = 0,5$, foi adicionado desoxicolato de sódio 0,01% a um dos frascos. Alíquotas de 5 ml foram coletadas nos tempos indicados para a determinação da densidade ótica.

FONTE: KAROLINE PREDIGER (DADOS NÃO PUBLICADOS)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A predição de RNAs não codificadores em bactérias do gênero *Aeromonas* baseou-se na utilização da ferramenta computacional Infernal 1.1.1 e foi possível identificar RNAs não codificadores em cinco espécies de *Aeromonas* spp., principalmente os RNAs não codificadores regulatórios. Partindo desta abordagem de predição foram descritas as funções dos ncRNAs regulatórios identificados. Nas cinco espécies de *Aeromonas* spp. (*A. sóbia*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. trota* e *A. caviae*) foram identificados 231 RNAs curtos (smallRNAs), sendo 50 ncRNAs regulatórios, 6 *riboswitches* e o restante RNAs ribossomais e RNAs transportadores. Os ncRNAs foram descritos como envolvidos em processos virulentos, que implicam na patogenicidade do organismo como, formação de biofilme para sobrevivência, regulação e formação dos flagelos para invasão e motilidade da bactéria, atuam em resposta ao stress de diferentes metabólitos como a glucose, o ferro e o magnésio.

Para a predição dos mRNA alvos dos ncRNA candidatos selecionados foi empregada a ferramenta TargetRNA2. Considerando que o gênero *Aeromonas* abriga espécies patogênicas como *A. veronii* B565, foi detectada a existência de regiões putativas de ilhas genômicas no genoma desta espécie pela utilização de três ferramentas computacionais. Quanto à função, os alvos dos ncRNAs regulatórios apresentaram-se bastante diversos como, por exemplo, proteínas de quimiotaxia, locomoção, invasão de tecidos e sistemas de secreção. Destaca-se a presença do gene *nudF*, que é alvo do ncRNA CsrB, em uma das ilhas genômicas preditas pelo ZIsland. A proteína NudF está envolvida na regulação da síntese do glicogênio. Utilizando o IslandView foi possível visualizar os genes *lysR*, *CheW*, *bvgS* que também são alvos de ncRNAs.

A expressão de alguns ncRNAs preditos foi confirmada através de sequenciamento de RNA (RNA seq) na presença ou ausência de desoxicolato de sódio. Foi observado aumento da expressão do 6S RNA, um resultado esperado uma vez que esse é expresso em fase estacionária. No caso do ncCsrB, que possui duas cópias gênicas, ambas tiveram expressão reduzida na condição experimental. O mesmo foi observado para o ncRNA Prrb_RsmZ, um ncRNA que também apresenta uma sequência motivo GGA e tem estrutura secundária semelhante ao ncCsrB. Isso poderia ser considerado um indício da ligação do ncRNA Prrb_RsmZ no mRNA *CsrA*.

Os resultados descritos mostram que os ncRNAs estão envolvidos em processos regulatórios complexos, alguns desses processos resultam na regulação de fatores de virulência, que podem desempenhar mecanismos patogênicos em uma possível interação patógeno-hospedeiro, no intuito de aprofundar-se nessas interações o trabalho deixa um leque de possibilidades futuras para investigação dos mecanismos fisiológicos que propiciam um caráter virulento e extremamente patológico a certas bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, A. M.; GEY, VAN PITTIUS, N. C.; CHAMPION, P. A.; COX, J.; LUIRINK, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; APPELMELK, J.; BITTER, W. **Type VII secretion *mycobacteria* show the way.** Nat. Rev. Microbiol. 11: 883-891, 2007;
- ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDER, K. A.; CHOPRA, A. K.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; FARUQUE, A. S. G.; SIRAJUL, I. M.; BRADLEY R. S.; MOLLBY, R. **Prevalence of Enterotoxin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated From Children with Diarrhea, Healthy Controls, and the Environment.** J. Clin. Microbiol. 38: 3785-3790, 2000;
- ANDERSON, S. T.; KAFOROU, M.; BRENT, A. J, *et al.* **Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa.** J. Med. 370:1712-1723, 2014;
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia.** v. 1. 2ª Ed. São Paulo : Moderna, 2004;
- ANGEL, M. F.; ZHANG, F.; JONES, M.; HENDERSON, J.; CHAPMAN, S. W. **Necrotizing fasciitis of the upper extremity resulting from a water moccasin bite.** Southern Medical Journal. 1090 – 1094, 2002;
- ASSIS, F. E. A.; WOLF, S.; SUREK, M.; DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FARAH, S. M. S. S.; PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C. M. T. **Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, southern Brazil.** Journal of Infection in Developing Countries. 8: 1609-1614, 2014;
- BARRICK J.; CORBINO, K.; WINKLER, W.; NAHVI, A.; MANDAL, M.; COLLINS, J.; LEE, M.; ROTH, A.; SUDARSAN, N.; JONA, I. **New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control.** Proc Natl Acad Sci. 101: 6421–6426, 2004;
- BERGHOFF, B. A.; GLAESER, J.; SHARMA, C. M.; VOGEL, J.; KLUG, G. **Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaerioides*.** Mol. Microbiol. 74: 1497–512, 2009;
- BORCHARDT *et al.* ***Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis.** Diseases. 9: 224-228, 2003;
- BREAKER, R. R. **Riboswitches and the RNA world.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 4, 2012;
- BOGDANOVIC, R.; COBELJI, C, M.; MARKOVI, C, M.; NIKOLI, C. V.; OGNJANOVI, C. M.; SARJANOVIC, L., *et al.* **Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis.** Pediatr. Nephrol. 5: 293–295, 1991;

CARNAHAN *et al.* ***Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens.** *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 560-564, 1991;

CAO, G. *et al.* **EspR, a Regulator of the ESX-1 Secretion System in *Mycobacterium Tuberculosis*, Is Directly Regulated by the Two-Component Systems MprAB and PhoP.** *Microbiology* 161:477-489, 2014;

CHITSAZ, H.; SALARI, R.; SAHINALP, S.C.; BACKOFEN, R. **A Partition Function Algorithm for Interacting Nucleic Acid Strands.** *Bioinformatics*. 25: 365–373, 2009;

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. **Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis.** *Microbes and Infection*. 1: 1129-1137, 1999;

CHRISTIE, P. J. **Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems.** *Biochim Biophys*. 1694: 219-234, 2004;

CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L.; COULTHURST, S. J. **Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon.** *Trends in Microbiology*. 24: 51-62, 2016;

CONWAY, D. J.; ROPER, C. **Micro-evolution and emergence of pathogens.** *Int. J. Parasitol*. 30: 1423-1430, 2000;

COSTA, T. R. D.; FELISBERTO-RODRIGUES, C.; MEIR, A.; PREVOST, M. S.; REDZEJ, A.; TROKTER, M.; WAKSMAN, G. **Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights.** *Nature reviews microbiology*. 13: 343-359, 2015;

D'ANTONIO, M.; D'ONORIO DE MEO, P.; PALLOCCA, M.; PICARDI, E.; D'ERCHIA, A. M.; CALOGERO, R. A.; CASTRIGNANÒ, T.; PESOLE, G. **RAP: RNA-Seq Analysis Pipeline, a new cloud-based NGS web application.** *BMC Genomics*. 1471-2164, 2015;

DA SILVA, C. A. **Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas* spp. obtidos no estado de Pernambuco.** Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Genética. 2015;

DASKALOV, H. **The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety.** *Food Control*. 17: 474 – 483, 2006;

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYAT, A. D. **Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife.** *Acta Trop*. 78: 103-116, 2011;

DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. **RNase E-dependente de processamento estabiliza MicX, um *Vibrio cholerae* sRNA.** *Mol. Microbiol*. 2: 373-385, 2007;

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. **EPEC's weapons of mass subversion**. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 28-34, 2005;

DENNIS, P. P.; OMER, A. **Small non-coding RNAs in Archaea**. *Curr Opin Microbiol.* 6: 685-94, 2005;

DIXON, B. **Natural Disaster Microbiology**. *Microbe.* 3: 312-313, 2008;

ECKER, D. J.; SAMPATH, R.; WILLETT, P.; WYATT, J. R.; SAMANT, V.; MASSIRE, C.; HALL, T. A.; HARI, K.; MCNEIL, J. A.; BÜCHEN-OSMOND, C.; BUDOWLE, B. **The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents**. *BMC Microbiology.* 5: 19, 2005;

EDBERG, S. C.; BROWNE, F. A.; ALLEN, M. J. **Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model**. *Critical Reviews in Microbiology.* 33: 89 – 100, 2007;

EDDY, S. R.; DURBIN, R. **RNA sequence analysis using covariance models**. *Nucleic acids research.* 22: 2079–2088, Disponível em: <<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8029015>>;

ELLIS, M. J.; TRUSSLER, R. S.; HANIFORD, D. B. **A cis-encoded sRNA, Hfq and mRNA secondary structure act independently to suppress IS200 transposition**. *Nucleic Acids Res.* 43: 6511–6527, 2015;

FARMER III, J. J.; ARDUINO, M. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. **The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas***. *The Prokaryotes.* 6: 564 – 596, 2006;

FIGUEIRA, V.; VAZ-MOREIRA, I.; SILVA, M.; MANAIA, C. M. **Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants**. *Water Research.* 45: 5599 – 5611, 2011;

FOSSE, T.; GIRAUD-MORIN, C.; MADINIER, I. ***Aeromonas hydrophila* with Plasmid-Borne Class A Extended-Spectrum β -Lactamase TEM-24 and Three Chromosomal Class B, C, and D β -Lactamases, Isolated from a Patient with Necrotizing Fasciitis**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48: 2342-2343, 2004;

GEORG, J.; HESS, W. **Cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75: 286–300, 2011;

GOTTESMAN, S. **Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria**. *Trends Genet.* 21: 399–404. 2005;

GREEN, E. R.; MECSAS, J. **Bacterial Secretion Systems – An overview**. *Microbiol Spectr.* 4, 2016;

GRIFFITHS-JONES, S. **Annotating Noncoding RNA Genes**. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8: 279–298, 2007;

GRIM, C. J.; KOZLOVA, E. V.; SHA, J.; FITTS, E. C.; VAN LIER, C. J.; KIRTLEY, M. L.; JOSEPH, S. J.; READ, T. D.; BURD, E. M.; TALL, B. D.; JOSEPH, S. W.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. K.; SHAKC, J. R. **Characterization of *Aeromonas hydrophila* Wound Pathotypes by Comparative Genomic and Functional Analyses of Virulence Genes.** mBio. 4: 1-13, 2013;

GRIM, C. J.; KOZLOVA, E. V.; PONNUSAMY, D.; FITTS, E. C.; SHA, J.; KIRTLEY, M. L.; VAN LIER, C. J.; TINER, B. L.; EROVA, T. E.; JOSEPH, S. J.; READ, T. D.; SHAK, J. R.; JOSEPH, S. W.; SINGLETARY, E.; FELLAND, T.; BAZE, W. B.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. K. **Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*.** Applied and Environmental Microbiology. 80: 4162-4183, 2014;

GRIJPSTRA, J.; ARENAS, J.; RUTTEN, L.; TOMMASSEN, J. **Autotransporter secretion: varying on a theme.** Research in Microbiology. 164: 562-582, 2013;

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. **The path to *Salmonella* in HACKER *et al.* Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur in vivo and in vitro in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates.** Microb. Pathogen. 8: 213-225, 1990;

HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. **Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens.** Biochim. Biophys. Acta. 1694: 181-206, 2004;

HENSEL, M. J.; SHEA, E.; GLEESON, C.; JONES, M. D.; DALTON, E.; HOLDEN, D. W. **Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection.** Science. 269: 400-403, 1995;

HERBIG, A.; NIESELT, K. **NocoRNAc: characterization of non-coding RNAs in prokaryotes.** BMC Bioinformatics. 12: 40, 2011;

HOE, *et al.* **Regulatory RNAs in Bacteria e Bacterial sRNAs.** 2009.

WARNECKE, F.; HESS, M. **A perspective: Metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts.** J Biotechnol. 142:91-95, 2009;

HUECK, C. J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** Mol. Biol. Rev. 62: 379-433, 1998;

HUTTENHOFER, A.; SCHATTNER, P.; POLACEK, N. **Noncoding RNAs: hope or hype?** Trends Genet. 21: 289-97, 2005;

IGBINOSA, I. H.; IGUMBOR, U. E.; AGHDASI, F.; TOM, M.; OKOH A. I. **Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health.** The Scientific World Journal. 313: 236-238, 2012;

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. **The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection.** Clinical Microbiology Reviews. 23: 35-73, 2010;

JOHANSSON, J.; COSSART, P. **RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens.** Trends Microbiol. 11:280-285, 2003;

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. M. **Update on the genus *Aeromonas*: despite progress, many questions about this pathogen remain unanswered.** ASM News, Ann Arbor. 66: 218-223, 2000;

JUHAS, M.; VAN DER MEER, J. R.; GAILLARD, M.; HARDING, R. M.; HOOD, D. W.; CROOK, D. W. **Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.** FEMS Microbiol. Rev. 33: 376-393, 2009;

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. **Pathogenic *Escherichia coli*.** Nat Rev Microbiol. 2: 123–140, 2004;

KERY, M. B.; FELDMAN, M.; LIVNY, J.; TJADEN, B. **TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria.** Nucleic Acids Res. 42: 124–129, 2014;

KHAJANCHI, B. K.; FADL, A. A.; BORCHARDT, M. A.; RICHARD, L.; BERG, R. L.; AMY, J.; HORNEMAN, A. J.; STEMPER, M. E.; JOSEPH, S. W.; MOYER, N. P.; SHA, J.; CHOPRA, A. K. **Distribution of Virulence Factors and Molecular RAPD of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission.** Applied and Environmental Microbiology. 76: 2313-2325, 2010;

KINGOMBE, B.; D'AOUST, J. Y.; HUYS, C. I.; HOFMANN, L.; RAO, M.; KWAN, J. **Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes.** Applied and Environmental Microbiology. 76: 425-433, 2010;

KINGOMBE, C. I. B.; HUYS, G.; TONOLLA, M.; ALBERT, J. M.; SWINGS, J.; PEDUZZI, R.; JEMMI, T. **PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp.** Applied and Environmental Microbiology. 65: 5293-5302, 1999;

KINGSFORD, C. L.; AYANBULE, K.; SALZBERG, S. L. **Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake.** Genome Biol. 8: 22, 2007;

KHOO, J. S.; CHAI, S. F.; MOHAMED, R.; NATHAN, S.; FIRDAUS-RAIH, M. **Computational discovery and RT-PCR validation of novel *Burkholderia* conserved and *Burkholderia pseudomallei* unique sRNAs.** BMC Genomics. 13: 13, 2012;

KUNIMOTO *et al.* **Bacteriology of a bear bite wound to a human: case report.** Journal of Clinical Microbiology. 42: 3374-3376, 2004;

LANGUILLE, M.; HSIAO, W.; BRINKMAN, F. **Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach.** BMC Bioinformatics, 2008;

LI, Y.; LIU, Y.; HUANG, H.; REN, Y.; ZHANG, Y.; LI, G.; ZHOU, Z.; WANG, L. **Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565.** J. Bacteriol. 193: 3389-90, 2011;

LIVNY, J.; FOGEL, M. A.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. **sRNAPredict: an integrative computational approach to identify sRNAs in bacterial genomes.** *Nucleic Acids.* 33: 4096–4105, 2005;

LLOYD, A. L.; RASKO, D. A.; MOBLEY, H. L. **Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*.** *Journal of bacteriology.* 189: 3532–3546, 2007;

LOREN *et al.* **ViennaRNA Package 2.0. Algorithms.** *Mol. Biol.* 6: 26, 2011;

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. **Family I. Aeromonadaceae.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. 2nd ed. Springer, 2005;

LÓPEZ-GOMOLLÓN, S. **Detecting sRNAs by Northern blotting Methods.** *Mol. Biol.* 732: 25-38, 2011.

MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. **Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Pleisiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of Congruence with result of DNA-DNA hybridizations.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 42: 412–421, 1992;

MARY *et al.* **Growth and survival of clinical vs. environmental species of *Aeromonas* in tap water.** *International Journal of Food Microbiology.* 69: 191-198, 2001;

MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist.** Harvard University Press, 1942. Disponível em: <<http://www.amazon.com/exec/obidos/redirect?tag=citeulike07-20&path=ASIN/0674862503>>;

MEYER, A.; PUHLER, A.; NIEHAUS, K. **The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*.** *Planta.* 231: 214-222, 2001;

MASSÉ, E.; GOTTESMAN, S. **A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 4620-4625, 2002;

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; THOMAS, J. **Emerging pathogens: *Aeromonas* spp.** *International Journal of Food Microbiology.* 28: 157-168, 1995;

MOREIRA, C. **WikiCiências.** 1: 174, 2010;

MORIEL *et al.* **Draft genome sequence of *Aeromonas caviae* 8LM, isolated from stool culture of a child with diarrhea.** *Genome Announc.* 3, 2015;

MOTA, L. J.; JOURNET, L.; SORG, I.; AGRAIN, C.; CORNELIS, G. R. **Bacterial injectisomes: needle length does matter.** *Science*, 2005;

NAHARRO, G.; RUBIO, P.; LUENGO, M. J. **Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens.** *Aeromonas*. 68, 2011;

NEUHAUS, K. *et al.* **Differentiation of ncRNAs from small mRNAs in Escherichia coli O157:H7 EDL933 (EHEC) by combined RNAseq and RIBOseq – ryhB encodes the regulatory RNA RyhB and a peptide, RyhP.** GEO, 2017.

NEYTS, K.; HUYS, G.; UYTENDAELE, M.; SWINGS, J.; DEBEVERE, J. **Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods.** Letters in Applied Microbiology. 31: 359-363, 2000;

NOJIMOTO *et al.* **Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1996.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 30: 385-388, 1997;

PADALON-BRAUCH *et al.* **Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence.** Nucleic Acids Research. 36: 1913–1927, 2008;

PALU, A. P.; GOMES, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; BALASSIANO, I. T.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, S. S. **Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates.** Food Microbiology. 27: 504-509, 2006;

PAPENFORT, K.; VOGEL, J. **Regulatory RNA in Bacterial Pathogens.** Cell Host and Microbe. 8:116–27, 2010;

PICHON, C.; FELDEN, B. **Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria.** Bioinformatics. 24: 2807-13, 2008;

POSTIC *et al.* **Regulation of virulence in *Francisella tularensis* by small noncoding RNAs.** Nature Preceedings. 2011;

PRASSE *et al.* **Regulatory RNAs in archaea: first target identification in methanoarchaea.** Biochem. Soc. Trans. 41: 344–349, 2013;

PREVOST, K.; SALVAIL, H.; DESNOYERS, G.; JACQUES, J. F.; PHANEUF, E.; MASSE, E. **The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis.** Mol Microbiol 64: 1260 –1273, 2007;

PUGSLEY, A. P. **The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria.** Microbiol. Rev. 57: 50-108, 1993;

QUEIROZ, K. **Ernst Mayr and the modern concept of species.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, EUA. 102: 6.600–6.607, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502030102>>;

- RIVAS, E.; KLEIN, R. J.; JONES, T. A.; EDDY, S.R. **Computational Identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics.** *Curr Biol.* 11: 1369-1373, 2001;
- REMAUT, H.; WAKSMAN, G. **Structural biology of bacterial pathogenesis.** *Curr Opin Struct Biol.* 14: 161-170, 2004;
- TOLEDO-ARANA, A.; REPOILA, F.; COSSART, P. **Small noncoding RNAs controlling pathogenesis.** *Curr Opin Microbiol.* 10: 182-188, 2007;
- SANTOS, F. P.; CASTRO, C. S. **RNA**, 2000;
- SCHRAG, S. J.; WIENER, P. **Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution.** *Trends Ecol. Evol.* 8:319-24, 1995;
- PAIN, A.; OTT, A.; AMINE, H.; ROCHAT, T., BOULOC, P.; GAUTHERET, D. **An assessment of bacterial small RNA target prediction programs.** *RNA biology.* 5: 509-513, 2015;
- SCOARIS, D. O.; COLACIT, J.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU, B. A.; DIAS B. P. **Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. Isolated from drinking water.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93: 111-122, 2008;
- SCHATTNER, M. **Human platelets express and are activated by galectin-8.** *Biochem. J.* 432: 535–547, 2005;
- SCHUBERT, R. H. W. **The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas*.** *International Journal of Systematic Bacteriology.* 17: 23–37, 1967;
- SCOGLIO *et al.* **Virulence factors in vibrios and *Aeromonas* isolated from seafood.** *Microbiologica.* 24: 273-280, 2011;
- SEN, K.; RODGERS, M. **Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification.** *Journal of Applied Microbiology.* 97: 1077-1086, 2004;
- SESHADRI *et al.* **Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades.** 188: 8272-8282, 2006;
- SETUBAL, C.; MEIDANIS, J. **Introduction to Computational Molecular Biology.** PWS Publishing. 320, 1997;
- SHARMA, C. M.; VOGEL, J. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. ***Biochem Biophys Res Commun.* 343: 950-955, 2006;**
- SINHA, S.; SHIMADA, T.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S. K.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; BALAKRISHNAN, G. **Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India.** *Journal of Medical Microbiology.* 53: 527- 534, 2004;

SOARES, S. *et al.* **GIPSy: Genomic island prediction software.** Journal of Biotechnology. 2015;

SPEARS, K. J.; ROE, A. J.; GALLY, D. L. **A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis.** FEMS Microbiol. 187-202, 2006;

SRIDHAR, J.; GUNASEKARAN, P. Computational small RNA prediction in bacteria. **Bioinform Biol Insights. 7: 83-95, 2013;**

STEUTEN, B.; SCHNEIDER, S.; WAGNER, R. **6S RNA: recent answers-future questions.** Mol. Microbiol. 91: 641–648, 2014;

SVENUNGSSON, B.; LAGERGREN, A.; EKWALL, E.; EVENGARD, B.; HEDLUND, K. O.; KARNELL, A.; LOFDAHL, S.; SVENSSON, L.; WEINTRAUB, A. **Enteropathogens in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Control Subjects: A 1-Year Prospective Study in a Swedish Clinic for Infectious Diseases.** Clinical Infectious Diseases. 30: 770–778, 2000;

TRAN, T. T.; ZHOU, F.; MARSHBURN, S.; STEAD, M.; KUSHNER, S. R.; XU, Y. **De novo computational prediction of non-coding RNA genes in prokaryotic genomes.** Bioinformatics. 25: 2897–2905, 2009;

THANASSI, D. G.; SAULINO, E. T.; HULTGREN, S. J. **The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway.** Curr Opin Microbiol. 1: 223-231, 1998;

THOMSON, B. C.; TISSERANT, E.; PLASSART, P., *et al.* **Soil conditions and land use intensification effects on soil microbial communities across a range of European field sites** Soil. Biol Biochem, 88: 403–413, 2015;

TRAPNELL, C., *et al.* **Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation.** Nat Biotechnol. 28: 511–515, 2010;

TOLEDO-ARANA, A.; REPOILA, F.; COSSART, P. **Small noncoding RNAs controlling pathogenesis.** Curr Opin Microbiol. 10:182–188, 2007;

TROTOCHAUD, A. E.; WASSARMAN, K. M. **A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription.** Nat Struct Mol Biol. 12: 313-319, 2005;

TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. **Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology.** BMC Microbiol. 9: 2, 2009;

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, J.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M. J.; GASCÓN, J. ***Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance.** Emerging Infectious Diseases. 9: 552-555, 2003;

- VOGEL, J.; WAGNER, E. G. **Target identification of small noncoding RNAs in bacteria.** *Curr Opin Microbiol.* 10: 262-270, 2007;
- VON GRAEVENITZ, A. **The role *Aeromonas* in diarrhea: a review.** *Infection.* 35: 59-64, 2007;
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**, 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014;
- ZHANG, A.; WASSARMAN, K. M.; ROSENOW, C.; TJADEN, B. C.; STORZ, G.; GOTTESMAN, S. **Análise global de pequenos RNA e mRNA alvos de Hfq.** *Mol. Microbiol.* 4:1111-1124, 2003;
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.** *Nat. Rev. Genet.* 10: 57–63, 2009;
- WASSARMAN, K.; ZHANG, A.; STORZ, G. **Small RNAs in *Escherichia coli*.** *Trends Microbiol.* 7: 37–42, 1999;
- WASSARMAN, K. M.; STORZ, G. **6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity.** *Cell* 101. 2000: 613-623, 2009;
- WEI, Y.; WANG, J.; XIA, X. **Coevolution between stop codon usage and release factors in bacterial species.** *Mol. Biol. Evol.* 33: 2357–2367, 2016;
- WEHNER, S., et al. **of *Listeria monocytogenes* by Semiconductor Sequencing Technology.** PLOS, 2014;
- WHO. **New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. Part I.** *Wkly Epidemiol.* 74: 98-101, 1999;
- WU *et al.* **Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan.** *Journal of Infection.* 54: 151-158, 2007.