

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAROLINE DE CAMPOS PREDIGER



FATORES DE VIRUÊNCIA E RESPOSTA À BILE DE
Aeromonas veronii bv sobria 312M

CURITIBA

2019

KAROLINE DE CAMPOS PREDIGER

FATORES DE VIRUÊNCIA E RESPOSTA À BILE DE
Aeromonas veronii bv sobria 312M

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cyntia M. T. Fadel-Picheth
Coorientador: Prof. Dr. Dieval Guizelini
Dr. Vinicius Weiss

CURITIBA

2019

Prediger, Karoline de Campos

Fatores de virulência e resposta à bile de *Aeromonas veronii* bv sobria. 312M [recurso eletrônico] / Karoline de Campos Prediger – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Cyntia M. T. Fadel-Picheth

Coorientador: Professor Dr. Dieval Guizelini

Coorientador: Dr. Vinícius Weiss

1. *Aeromonas*. 2. Virulência. 3. Resistência. 4. Genoma. 5. Transcriptoma.
I. Fadel-Picheth, Cyntia M. T. II. Guizelini, Dieval. III. Weiss, Vinícius.
IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **KAROLINE DE CAMPOS PREDIGER** intitulada: **FATORES DE VIRULÊNCIA E RESPOSTA À BILE EM AEROMONAS VERONII BV SOBRIA 312M**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2019.

CYNTIA MARIA TELLES FADEL PICHETH
Presidente da Banca Examinadora

JERONIZA NUNES MARCHAUKOSKI
Avaliador Externo (UFPR)

DAYANE ALBERTON
Avaliador Interno (UFPR)

CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA
Avaliador Externo (PUC/PR)

HELISSON FAORO
Avaliador Externo (ICC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor infinito para comigo, por estar sempre ao meu lado, abrindo muitas portas e colocando pessoas boas no meu caminho, por todos os dias de trabalho, por me dar forças para levantar quando caí e por me iluminar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Enio e Eni e irmãos Nathalia e Heinrich, que são reflexo do cuidado de Deus na minha vida. Que mesmo distantes fisicamente, estiveram comigo, torcendo e apoiando incondicionalmente todas as minhas decisões. Amo vocês!

Ao meu melhor amigo e namorado Marco, por estar ao meu lado sempre, por trazer mais felicidade à minha vida, por todo amor quando mais precisei, que foram a força para chegar até o final. Prin, te amo muito!

De forma especial, agradeço à minha orientadora, prof^a Cyntia, pela oportunidade e confiança em mim depositada. Agradeço o privilégio de ter trabalhado e convivido esses anos com uma pessoa de extrema competência e sabedoria em tudo que faz. Muito orgulho de ser sua orientanda. Mas acima de tudo, agradeço seu apoio nos momentos mais difíceis, nos quais tive uma amiga ao meu lado me fortalecendo. Prof, minha eterna gratidão!

Ao meu co-orientador professor Dieval, pelo seu conhecimento, sabedoria e sugestões que permitiram o desenvolvimento deste trabalho, em especial, nas análises de bioinformática.

A todos os colegas e amigos que fiz no Laboratório de Bacteriologia Clínica, pela amizade e colaboração, em especial a minha amiga Cibelle, minha companheira desde o início. Ci, sou muito grata pela tua ajuda e generosidade e agradeço muito por você ter cruzado meu caminho.

Muito obrigada ao Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo apoio científico e estrutural e, em especial aos Professores Emanuel e Berenice pela oportunidade e confiança que permitiram a construção deste trabalho.

À Vânia Pankievicz e Helba Cirino pelo auxílio nos experimentos e análise do transcriptoma.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas, agradeço por todo apoio técnico e estrutural. Em especial ao laboratório de Bioquímica Clínica e ao Prof^o Geraldo Picheth, pelo auxílio nos testes estatísticos. À Prof^a Dayane Alberton pelo

conhecimento compartilhado, em especial nos experimentos de proteoma. Ao prof^o Glaucio Valdameri pelo ajudas e sugestões nos experimentos de qPCR e ensaios celulares.

À Ingrid Zattoni que não mediu esforços e foi essencial nos ensaios de viabilidade e adesão celular.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para realização desta conquista. Ficam aqui registrados em papel meus sinceros agradecimentos, mas muito mais importante, ficam guardadas em um local muito especial, todas essas pessoas que marcaram de forma tão singular esta etapa de minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

Aeromonas veronii biovar sobria são bacilos Gram-negativos onipresentes em ambientes aquáticos e associados a doenças humanas, como infecções em feridas, septicemia e diarreia. Neste trabalho apresentamos o *draft* do genoma, identificamos características de virulência associadas a estirpe *A. veronii* biovar sobria 312M e verificamos a sua resposta ao sal biliar desoxicolato de sódio. A estirpe teve sua identidade confirmada pelo ANI e expressou características associadas com virulência como beta-hemólise, *motilidade swimming e swarming* e capacidade de formar biofilme. Mostrou resistência à ampicilina, ampicilina/sulbactam e amoxicilina-ácido clavulânico. O genoma de *A. veronii* biovar sobria 312M contém 4,57 Mbp com 58,6% de GC e 4262 sequências codificadoras. Diversas vias completas associadas ao metabolismo do carbono foram identificadas no genoma, incluindo glicólise e gliconeogênese, ciclo do ácido tricarboxílico, utilização de frutose, galactose, manitol, sacarose, maltose e N-acetil-D-glucosamina, que podem contribuir para a colonização do hospedeiro. Um grande número de genes associados à virulência foi encontrado no genoma, como os genes que codificam os flagelos polar e lateral; Tipo I pilus, Tap, Msh e Flp tipo IV pilus; enterotoxina citotônica termolábil, enterotoxina citotóxica e hemolisinas; sistemas de secreção tipo II, III e VI. Os genes de resistência antimicrobiana que codificam a oxacilinase classe D AmpS e a carbapenemase classe B de espectro estreito foram identificados. Em relação a resposta de *A. veronii* bv sobria ao sal biliar desoxicolato de sódio verificou-se que a exposição da bactéria a este agente aumenta a adesão a células HeLa e confere resistência à polimixina. Além disso, o transcriptoma revelou que quando exposta ao sal biliar, *A. veronii* bv sobria apresentou diversos genes diferencialmente expressos, sendo que a qPCR confirmou que os genes NupC (envolvidos no transporte de nucleotídeos), FliQ (relacionado a Biossíntese flagelar) e hemolisina foram reprimidos, enquanto os genes PhoP (proteína reguladora transcricional), aaABC (transportador ABC), L-PSO (endoribonuclease), PotB (transportador ABC), SmrB (endonuclease) e tetR (regulador transcricional) tiveram sua expressão induzida na presença de desoxicolato de sódio. Em conclusão, os dados sugerem que *A. veronii* biovar sobria 312M possui alto potencial de virulência, apresenta resistência a classes limitadas de antimicrobianos, e que o estresse com o sal biliar aumenta a adesão de *A. veronii* bv sobria facilitando o contato com o hospedeiro e provavelmente está associado com modificações do lipídeo A. Os resultados também sugerem que a resposta de *Aeromonas* ao sal biliar é estirpe dependente.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Virulência. Resistência. Genoma. Transcriptoma.

ABSTRACT

Aeromonas veronii biovar sobria are Gram-negative bacilli ubiquitous in aquatic environments and associated with human diseases such as wound infections, septicemia and diarrhea. In this work we present the genome draft, virulence characteristics associated with *A. veronii* biovar 312M and verified its response to bile salt deoxycholate sodium. The strain had its identity confirmed by ANI and expressed characteristics associated with virulence such as beta-hemolysis, swimming and swarming motility and biofilm forming ability. It showed resistance to ampicillin, ampicillin / sulbactam and amoxicillin-clavulanic acid. The genome of *A. veronii* biovar sobria 312M contains 4.57 Mbp with 58.6% GC and 4262 coding sequences. Several complete pathways associated with carbon metabolism have been identified in the genome, including glycolysis and gluconeogenesis, tricarboxylic acid cycle, use of fructose, galactose, mannitol, sucrose, maltose and N-acetyl-D-glucosamine, which may contribute to the colonization of host. A large number of genes associated with virulence were found in the genome, such as the genes encoding the polar and lateral flagella; Type I pilus, Tap, Msh and Flp type IV pilus; thermolabile cytotoxic enterotoxin, cytotoxic enterotoxin and hemolysins; secretion systems type II, III and VI. Antimicrobial resistance genes encoding the class D oxacillinase AmpS and the narrow spectrum class B carbapenemase were identified. Regarding the response of *A. veronii* bv to sodium bile salt deoxycholate, it was found that exposure of the bacterium to this agent increases adhesion to HeLa cells and confers resistance to polymyxin. In addition, the transcriptome revealed that when exposed to bile salt, *A. veronii* bv sobria presented several differentially expressed genes, with qPCR confirming that the NupC (involved in nucleotide transport), FliQ (related to flagellar Biosynthesis) and hemolysin were repressed while PhoP (transcriptional regulatory protein), aaABC (ABC transporter), L-PSO (endoribonuclease), PotB (ABC transporter), SmrB (endonuclease) and tetR (transcriptional regulator) genes had their expression induced in the presence of deoxycholate of sodium. In conclusion, the data suggest that *A. veronii* biovar sobria 312M has high virulence potential, presents resistance to limited classes of antimicrobials, and that stress with bile salt increases the adhesion of *A. veronii* bv sobria facilitating contact with the host and is probably associated with modifications of lipid A. The results also suggest that the response of *Aeromonas* to bile salt is strain dependent.

Key-words: *Aeromonas*. Virulence. Resistance. Genome. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	34
FIGURA 2. ANOTAÇÃO DO GENOMA DE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M EM SUBSISTEMAS PELO ANOTADOR RAST	55
FIGURA 3. ENSAIOS DE MOTILIDADE <i>SWIMMING</i> E <i>SWARMING</i> DE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M.....	59
FIGURA 4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M.....	63
FIGURA 5. RNA TOTAL DA ESTIRPE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M.....	68
FIGURA 6. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DA ESTIRPE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M.....	79
FIGURA 7. PERFIL PROTEICO DE <i>A. trota</i> E <i>A. hydrophila</i>	81
FIGURA 8. PERFIL PROTEICO DE <i>A. veronii</i> bv sobria 49H.....	82
FIGURA 9. PERFIL PROTEICO DE <i>A. caviae</i> E <i>A. hydrophila</i>	82

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES EM <i>A. veronii</i> bv sobria NA PRESENÇA DE DOC 0,1%.....	73
GRÁFICO 2. VIABILIDADE DE CÉLULAS HELA INFECTADAS COM <i>A. veronii</i> bv sobria 312M NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DOC 0,1% APÓS 60 E 90 MINUTOS DE CONTATO.	76
GRÁFICO 3. ADESÃO DE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M NA AUSÊNCIA E APÓS CHOQUE COM DOC 0,1% POR 60 OU 90 MINUTOS EM CÉLULAS HELA.	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. GENOMAS DE <i>Aeromonas</i> SEQUENCIADOS E PUBLICADOS.....	27
TABELA 2. INFORMAÇÕES SOBRE AS BACTÉRIAS ESTUDADAS.....	35
TABELA 3. GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA EM <i>Aeromonas</i>	41
TABELA 4. RESUMO DA MONTAGEM DO GENOMA DE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M.....	51
TABELA 5. VALORES DE ANI DETERMINADOS PARA <i>A. veronii</i> bv sobria 312M EM RELAÇÃO A OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Aeromonas</i> COM GENOMA DEPOSITADOS NO NCBI	51
TABELA 6. GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE <i>A. veronii</i> bv sobria 312M.....	57
TABELA 7. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DOC 0,1%.....	69
TABELA 8. INICIADORES UTILIZADOS PARA VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM EXPERIMENTOS DE PCR EM TEMPO REAL.	74
TABELA 9. CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE PCR EM TEMPO REAL E EFICIÊNCIA DAS REAÇÕES... 74	
TABELA 10. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM <i>A. veronii</i> bv sobria 312M NA PRESENÇA DE DOC 0,1% DETERMINADOS POR PCR EM TEMPO REAL.....	75
TABELA 11. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DOC 0,1%.....	76
TABELA 12. EFEITO DO DOC EM RELAÇÃO À SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS EM <i>Aeromonas</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI	– <i>Average Nucleotide Identity</i> - Identidade média de nucleotídeos
BLAST	– <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTp	– <i>Protein Basic Local Alignment Search Tool</i>
BHI	– <i>Brain Heart Infusion</i> - Caldo Infusão de Cérebro e Coração
bv	– biovar
DMEM	– <i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DO	– Densidade ótica
DOC	– Desoxicolato de sódio
HG	– Grupo de Hibridização
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	– Sequenciamento de Nova Geração
PBS	– Tampão Salina Fosfato
RAST	– <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RNA	– Ácido ribonucleico
rRNA	– Ácido ribonucleico ribossômico
SDS-PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio
T2SS	– Sistema de secreção tipo II
T3SS	– Sistema de secreção tipo III
T6SS	– Sistema de secreção tipo VI
tRNA	– Ácido ribonucleico transportador
Vh	– Voltagem/hora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 DESCRIÇÃO DO GÊNERO	16
2.2.1 Características gerais	16
2.2.2 Distribuição	16
2.2.3 Importância clínica	17
2.2.4 Mecanismos de virulência	20
2.2.5 Identificação de <i>Aeromonas</i>	25
2.2.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos	28
2.3 RESISTÊNCIA À BILE	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 BACTÉRIAS ESTUDADAS	34
4.2 TESTES <i>IN VITRO</i>	35
4.2.1 Atividade hemolítica	35
4.2.2 Ensaio de adesão e viabilidade celular	35
4.2.3 Motilidade <i>swimming</i> e <i>swarming</i>	36
4.2.4 Capacidade de formar biofilme	37
4.2.5 Perfil de suscetibilidade aos antibióticos	37
4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA GENÔMICO	38
4.3.1 Isolamento e quantificação do DNA genômico	38
4.3.2 Sequenciamento no equipamento 454 GS Junior	38
4.3.3 Sequenciamento na plataforma Illumina	39
4.3.4 Montagem do genoma	39
4.3.5 Average Nucleotide Identity – ANI	40
4.3.6 Anotação do genoma	40
4.3.7 Pesquisa de genes associados à virulência e resistência	41
4.4 RESPOSTA AO SAL BILIAR DESOXICOLATO DE SÓDIO	42
4.4.1 Transcriptoma	42

4.4.2 Comparação do perfil proteico de <i>Aeromonas</i>	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE <i>A. VERONII</i> BV SOBRIA 312M....	48
5.1.1 Sequenciamento e montagem do genoma	48
5.1.2 Average Nucleotide Identity – ANI.....	51
5.1.3 Anotação do genoma	53
5.1.4 Genes associados à virulência e resistência.....	56
5.2 TRANSCRIPTOMA	67
5.2.1 Qualidade do RNA total	67
5.2.2 Sequenciamento do mRNA (RNA-seq)	68
5.2.3 Análise da expressão diferencial	69
5.3 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	75
5.4 VIABILIDADE E ADESÃO CELULAR.....	76
5.5 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Aeromonas</i> FRENTE AO DESOXICOLATO DE SÓDIO	78
5.6 PERFIL PROTEICO	81
6 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Aeromonas* pertence à família *Aeromonadaceae*, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glucose, apresentam atividade de citocromo oxidase e catalase. Bactérias deste gênero estão amplamente distribuídas na natureza, principalmente no ambiente aquático. Crescem em meios laboratoriais utilizados na rotina, tais como ágar infusão de cérebro e coração, MacConkey, ágar sangue, possuem a capacidade de produzir diversas exoenzimas tais como amilase, protease, fosfolipase e DNase, e apresentam resistência ao agente vibriostático O/129 (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH 2005; JANDA; ABBOTT, 2010; MORRIS; HORNEMAN, 2019).

Aeromonas podem causar uma variedade de infecções em humanos, e estas geralmente estão associadas com a ingestão de água e/ou alimentos contaminados e também contato com água contaminada (KHAJANCHI et al., 2010; JANDA; ABBOTT, 2010). As gastroenterites são as infecções mais frequentemente associadas com *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010; MORRIS; HORNEMAN, 2019) atingindo principalmente crianças e idosos; a apresentação clínica varia de diarreias agudas a crônicas, aquosas a sanguinolentas (GRACEY et al., 1982; DEODHAR et al., 1991; ALBERT et al., 2000; VILA et al., 2003; MORRIS; HORNEMAN, 2019). *Aeromonas* também são causas de infecções extra-intestinais, tais como celulite, infecções em ferimentos, sepse, infecções do trato urinário, respiratório, meningite, fasciite necrotizante, entre outras (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; AL-BENWAN et al., 2007; TENA et al., 2007; DWIVEDI et al., 2008; VON GRAEVENITZ, 2007; TAO et al., 2009; DALLAGASSA et al., 2018; MORRIS; HORNEMAN, 2019).

Atualmente são reconhecidas cerca de 30 espécies de *Aeromonas* (<http://www.bacterio.net/aeromonas.html>) e, destas, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* sobria e *A. dhakensis* respondem por aproximadamente 96% das infecções causadas por bactérias deste gênero em humanos (JANDA; ABBOTT, 2010; TEUNIS; FIGUERAS, 2016).

Diversas características associadas com virulência já foram descritas em *Aeromonas* como a presença de pili, flagelos, cápsula e a produção de uma variedade de

hemolisinas, toxinas citotônicas e citotóxicas entre outros (CHOPRA; HOUSTON, 1999; GRIM et al., 2014).

Para provocar infecção um enteropatógeno deve entrar em contato com o hospedeiro, superar os seus mecanismos de defesa, estabelecer-se no sítio de infecção e causar doença. No caso de gastroenterite causada por *Aeromonas* a rota presumida da infecção ocorre pela ingestão de água ou alimento contaminado (KHAJANCHI et al., 2010; JANDA; ABBOTT, 2010), e a bactéria deve então sobreviver ao pH ácido do estômago, se instalar no intestino e competir com a microbiota normal (JANDA; ABBOTT, 2010). Além disso, outra barreira a ser superada para colonizar o intestino é a presença da bile, uma secreção que contém entre os seus componentes os sais biliares. Estes atuam como detergentes e, portanto, apresentam atividade antimicrobiana. Dessa forma, a tolerância dos enteropatógenos à bile é fundamental para a sua sobrevivência e a colonização do intestino (BEGLEY et al., 2005), e até o momento praticamente não há informações disponíveis sobre a resposta à bile em *Aeromonas*.

Muitos potenciais fatores de virulência devem estar envolvidos no processo complexo que leva ao desenvolvimento da gastroenterite, mas relativamente poucos já foram estudados em *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010).

Visando contribuir para o conhecimento sobre os fatores potencialmente associados ao desenvolvimento de gastroenterite por *Aeromonas*, os objetivos desse trabalho foram verificar a presença de potenciais genes de virulência no genoma de *A. veronii* biovar sobria estirpe 312M, que foi isolada como único enteropatógeno de paciente com diarreia, e estudar a sua resposta frente ao sal biliar desoxicolato de sódio.

A estratégia utilizada para alcançar os objetivos envolveu o sequenciamento do genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, a obtenção do transcriptoma da bactéria crescida na presença e na ausência de desoxicolato de sódio e a realização de testes fenotípicos.

Os resultados indicam *A. veronii* bv sobria possui alto potencial de virulência e que sua resposta ao estresse causado pela bile é complexa e que diferentes mecanismos estão envolvidos nesse processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

A palavra “Aeromonas” deriva do grego *aer* que significa ar ou gás e *monas* que significa unidade (unidade produtora de gás) (ISONHOOD e DRAKE, 2002). A primeira descrição de *Aeromonas* foi realizada em 1891 por Sanarelli que isolou a bactéria de rãs com septicemia, denominada *Bacillus hydrophilus fuscus*. O gênero *Aeromonas* foi proposto Kluyver e Van Niel em 1936 (FARMER III; ARDUINO; HICKMAN-BRENNER, 2006). Com base nas características fenotípicas o gênero foi inicialmente incluído na família *Vibrionaceae* que compreendia os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. Posteriormente, estudos de hibridização realizados entre os membros daquela família sugeriram que o gênero *Aeromonas* era suficientemente diferente dos demais e merecia a classificação em uma nova família. Análises subsequentes realizadas em 1986 por Colwell, MacDonell e De Ley utilizando também análises de 5S e 16S rRNA demonstraram que em termos evolutivos o gênero *Aeromonas* era aproximadamente equidistante das famílias *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae* levando à criação da família *Aeromonadaceae*. Posteriormente, Martinez-Murcia e colaboradores mostraram, através do sequenciamento de 16S rDNA, que *Aeromonas* formam um ramo distinto dentro das *Gammaproteobacteria* (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005).

A taxonomia desse gênero encontra-se em constante atualização. Até 1980 apenas quatro espécies de *Aeromonas* eram reconhecidas, atualmente há aproximadamente 30 espécies aceitas neste gênero (<http://www.bacterio.net/aeromonas.html>). Pelo menos 12 delas foram associadas com infecções em humanos, mas *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv sobria e *A. dhakensis* são consideradas as de maior relevância clínica, representando cerca de 96% das espécies de *Aeromonas* identificadas (JANDA; ABBOTT, 2010; TEUNIS; FIGUERAS, 2016).

2.2 DESCRIÇÃO DO GÊNERO

2.2.1 Características gerais

O gênero *Aeromonas* compreende bacilos Gram-negativos retos, não esporulados, que ocorrem isoladamente e ocasionalmente em pares ou cadeias curtas; são anaeróbios facultativos, quimioorganotróficos, fermentam glucose, utilizam sais de amônio como única fonte de nitrogênio e tem atividade de oxidase e catalase (JANDA; ABBOTT, 2010).

A temperatura de crescimento pode variar entre 0 e 42°C, sendo o gênero dividido em dois grupos principais, um contendo espécies mesofílicas com crescimento ótimo a 37° C, móveis e inclui algumas espécies que podem causar infecções em humanos. O outro grupo contém espécies psicofílicas, imóveis, e é constituído por micro-organismos que geralmente causam doenças apenas em peixes. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 4,5 a 9,0. A maioria das espécies é mesofílica, sendo as bactérias móveis por meio de flagelo polar e algumas espécies podem apresentar flagelos laterais (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005; JANDA; ABBOTT, 2010; MORRIS; HORNEMAN, 2019).

2.2.2 Distribuição

Aeromonas são amplamente distribuídas na natureza, principalmente no ambiente aquático incluindo água potável e água recreacional e não são considerados organismos marinhos, embora possam ser encontrados em sistemas marinhos com interface com água doce. Também podem ser encontradas no solo, produtos agrícolas e esgoto (HORNEMAN; ALI, ABBOTT, 2007; JANDA; ABBOTT, 2010). *Aeromonas* também tem sido isoladas a partir de diversos alimentos como vegetais, leite e produtos lácteos, carnes e peixes (NEYTS et al., 2000; MCMAHON; WILSON, 2001; JANDA; ABBOTT, 2010), sugerindo que a colonização do trato gastrointestinal humano seja feito decorrente do consumo de água e alimentos contaminados, uma vez que essas bactérias não pertencem a microbiota intestinal normal, indicando o risco potencial para a saúde que a presença desses micro-organismos na água pode representar (KHAJANCHI et al., 2010; JANDA; ABBOTT, 2010).

2.2.3 Importância clínica

A capacidade de *Aeromonas* causar doenças em diferentes espécies animais já está bem estabelecida e documentada na literatura científica. O primeiro relato de infecção causada por *Aeromonas* em humanos foi descrito em 1954, em uma mulher na Jamaica diagnosticada com miosite, e posteriormente a bactéria foi reconhecida como causa de outras infecções. Mas desde 1961, quando uma estirpe de *Aeromonas* spp. foi isolada de fezes humanas, estes micro-organismos vem sendo incriminados também como agentes causadores de diarreia (VON GRAEVENITZ, 2007). No entanto, o papel de *Aeromonas* como agente etiológico de diarreia tem sido questionado. Isto se deve principalmente ao fato do não preenchimento dos Postulados de Koch, a falta de surtos de diarreia e do baixo número de indivíduos que desenvolveram a doença aguda no único estudo realizado em humanos (VON GRAEVENITZ, 2007; JANDA; ABBOTT, 2010; TEUNIS; FIGUERAS, 2016).

Entretanto as evidências que suportam o papel de *Aeromonas* como patógeno intestinal provem de relatos de casos nos quais a bactéria é inquestionavelmente a causa da diarreia e o diagnóstico é baseado não somente no isolamento do micro-organismo das fezes mas também na evidência da resposta imune do doente e/ou evidência patológica de infecção; e em análises epidemiológicas realizadas com controles sem a doença e de taxas de colonização muito baixas em pessoas assintomáticas (JANDA; ABBOTT, 2010).

Estudo recente que reavaliou a enteropatogenicidade de *Aeromonas* considerando os resultados de um trabalho anterior realizado em humanos e “experimentos naturais” definidos como surtos nos quais números e dose e/ou concentração da bactéria nos alimentos contaminados foram reportadas, indicou que os resultados foram marcadamente diferentes nas duas situações. No primeiro caso a ingestão mesmo de altas concentrações da bactéria resultou em baixo risco de doença aguda, diferente dos “experimentos naturais” nos quais o risco de doença foi muito maior mesmo em concentrações bem menores da bactéria. Os resultados são consistentes com elevada infectividade de *Aeromonas* e uma variação na suscetibilidade à doença entérica aguda similar à observada para outros enteropatógenos como *Campylobacter* e *Salmonella*. A conclusão é que *Aeromonas* deve ser considerada como enteropatógeno humano (TEUNIS; FIGUERAS, 2016).

2.2.3.1 Infecções gastrintestinais

Gastroenterite é o problema de saúde mais frequentemente associado com *Aeromonas* e pode apresentar manifestações clínicas variadas, desde doença diarreica aguda autolimitada de curta duração, diarreia crônica em crianças, idosos ou imunocomprometidos e também diarreia dos viajantes. Pode ocorrer febre, dor abdominal, vômito, desidratação, presença de muco e sangue nas fezes (ALBERT et al., 2000; ESSERS et al., 2000; VILA et al., 2003; ALBARADO; SAMPER; GUZMÁN, 2005; LONGA et al., 2005; MORRIS; HORNEMAN, 2019).

Nas últimas décadas, *Aeromonas* têm sido reconhecidas como agentes etiológicos relevantes em infecções gastrintestinais em todo o mundo, embora a frequência varie amplamente entre os diferentes estudos. Como exemplos, temos a prevalência de 1,6% relatada em Israel (SENDEROVICH et al., 2012), na Índia foram relatadas prevalências variando de 1,8% a 6,5% (DEODHAR et al., 1991; SINHA et al., 2004), 2,5% em Taiwan (CHEN et al., 2015), 4,5% na China (LI et al., 2015), 4,8% na Suíça (ESSERS et al., 2000), 6,4% nos Estados Unidos (MOYER, 1987), 10,2% na Austrália (GRACEY et al., 1982), 22,2% no Paquistão e Bangladesh (QAMAR et al., 2016). Apesar da variação na prevalência e da ampla distribuição geográfica indicadas acima, as espécies de *Aeromonas* mais comumente associadas com gastroenterite são *A. caviae*, *A. veronii* bv sobria, *A. hydrophila* e *A. dhakensis* (TEUNIS; FIGUERAS 2016).

Embora *Aeromonas* não faça parte do rol de enteropatógenos pesquisados rotineiramente, estudos realizados em diferentes estados do Brasil mostraram a importância dessas bactérias como agentes de diarreia em crianças e adultos, com prevalência variando de 2,6% a 21,9% (NOJIMOTO et al., 1997; GUERRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; SUREK et al., 2010; ASSIS et al., 2014). *Aeromonas* também foram isoladas de 2,4% de *swabs* retais de neonatos internados em unidades de terapia intensiva com diarreia aguda (PEREIRA et al., 2008) e foram associadas com um surto de diarreia ocorrido em 2004 em São Bento do Una, Pernambuco (HOFER et al., 2006).

As espécies isoladas no país incluem *A. caviae*, *A. veronii* bv sobria, *A. hydrophila*, *A. veronii* bv veronii, *A. media*, *A. jandaei* e *A. schubertii*. As três primeiras são as mais frequentemente isoladas (HOFER et al., 2006; GUERRA et al., 2007; SUREK et al., 2010; ASSIS et al., 2014).

Após a entrada no hospedeiro, um enteropatógeno deve ser capaz de resistir às barreiras fisiológicas normais como pH ácido no estômago, atingir o sítio de infecção, evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro e produzir doença. Para tanto, precisam competir com a microbiota normal, estabelecer-se no intestino e utilizar os nutrientes disponíveis, o que envolve diversos atributos como motilidade, adesão, formação de biofilme, produção de toxinas e vias metabólicas específicas (JANDA; ABBOTT, 2010; FUCHS et al., 2012).

2.2.3.2 Infecções extra-intestinais

As infecções extra-intestinais causadas por *Aeromonas* incluem infecções primárias como cistite, infecção ocular e de ferimentos tanto em indivíduos imunocompetentes como também em imunocomprometidos, bem como infecções graves como septicemia, peritonite, osteomielite, pancreatite, abscessos hepáticos, infecções do trato respiratório, celulite, ceratite, endoftalmite, úlcera de córnea, meningite, fasciíte necrotizante, entre outras, geralmente em pacientes imunodeprimidos (CHENG et al., 2004; AL-BENWAN et al., 2007; TENA et al., 2007; WU et al., 2007; CHOI et al., 2008; DWIVEDI et al., 2008; LAMY et al., 2009; TAO et al., 2009; RYAN; HIGGINS, DOYLE; 2017; MORRIS; HORNEMAN, 2019). As principais condições predisponentes para infecções graves causadas por *Aeromonas* incluem cirrose, doenças hepatobiliares e doenças hematológicas malignas (DWIVEDI et al., 2008; JANDA; ABBOTT, 2010).

O desenvolvimento das infecções extra-intestinais causadas por *Aeromonas* pode ocorrer a partir do contato de ferimentos com a bactéria na água, e tipicamente ocorre nas extremidades após traumatismos aquáticos (infecções de feridas, que podem levar a celulite, mionecrose, fasciíte necrotizante e bacteremia); afogamento (infecções do trato respiratório); terapia com sanguessuga (infecção de ferida, celulite e complicações como septicemia); translocação endógena da bactéria do trato gastrointestinal para o sistema circulatório; de feridas infectadas para o sangue, e raramente por mordidas de animais (JANDA; ABBOTT, 2010; MORRIS; HORNEMAN, 2019).

2.2.4 Mecanismos de virulência

A patogenicidade de *Aeromonas* é multifatorial e diversos fatores de virulência já foram identificados nestas bactérias, como descrito a seguir.

2.2.4.1 Cápsula

A cápsula é uma estrutura que envolve a membrana externa da célula bacteriana. É altamente hidratada e composta por monossacarídeos ligados entre si por ligações glicosídicas formando homo ou hetero-polímeros. Esta estrutura participa das interações das bactérias com o meio ambiente e representa um importante fator de virulência evitando a fagocitose, também atua como uma barreira contra toxinas hidrofóbicas (TOMÁZ, 2012).

2.2.4.2 Lipopolissacarídeo

Lipopolissacarídeos (LPS) são macromoléculas de estrutura complexa que compõem a porção externa da membrana externa de bactérias gram-negativas. O LPS contém três porções: lipídio A, porção mais interna e responsável pela toxicidade da estrutura; núcleo oligossacarídeo e o carboidrato específico ou antígeno O, parte mais exposta à superfície e cuja composição varia amplamente, medeia a patogenicidade protegendo as bactérias infectantes da lise pelo sistema complemento e da fagocitose (WHITFIELD; VALVANO, 1993; YANG et al., 2013).

A atividade mais proeminente do LPS é sua capacidade imunoestimulatória. Quando há liberação do lipídio A de bactérias lisadas e interação deste com células do sistema imune inato, ocorre uma liberação de mediadores endógenos, iniciando uma resposta inflamatória e imune, essenciais para a defesa antibacteriana. Esse mecanismo protetor pode levar a uma resposta fisiopatológica aguda, conhecida como choque séptico ou endotóxico, caracterizado por febre, hipotensão, insuficiência respiratória e renal e coagulação intravascular disseminada. Esses efeitos são consequências da ativação celular pelo LPS e a desregulação subsequente da resposta inflamatória do hospedeiro (TOMÁZ, 2012).

2.2.4.3 Sistemas de secreção

As bactérias desenvolveram uma variedade de nanomáquinas macromoleculares altamente especializadas que secretam uma ampla gama de substratos, como pequenas moléculas, proteínas e DNA. Essas moléculas têm papéis fundamentais na resposta de uma bactéria ao meio ambiente e em vários processos fisiológicos, incluindo adesão, patogenicidade, adaptação e sobrevivência (COSTA et al., 2015).

Para transportar proteínas para a superfície celular ou para o espaço extracelular, as bactérias Gram-negativas desenvolveram diferentes sistemas de secreção denominados sistemas de secreção tipo I, II, III, IV, V e VI (HENDERSON et al., 2004).

Dependendo do sistema de secreção, os substratos segregados têm três destinos possíveis: permanecem associados à membrana externa, são liberados no espaço extracelular ou são injetados em uma célula alvo eucariótica ou bacteriana (COSTA et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos no transporte de proteínas através da membrana citoplasmática podem ser divididos em dois grupos: Sec-dependente e Sec-independente. A via Sec-dependente inclui o sistema de secreção tipo II e V (T2SS e T5SS), utiliza um mecanismo de secreção de duas etapas, através de uma maquinaria comum, a Sec translocase, utilizada para transporte através da membrana interna. As vias sec-independentes permitem a exportação do citoplasma para o espaço extracelular ou célula alvo num só passo e não envolvem intermediários periplasmáticos. Estas vias incluem sistemas de secreção tipo I, III, IV e VI, embora o tipo IV também possa empregar a via Sec-dependente (KOSTAKIOTI et al., 2005).

Os sistemas de secreção III (T3SS) e VI (T6SS) desempenham um papel crítico na virulência de muitas bactérias Gram-negativas, são frequentemente ativados pelo contato com células alvo e liberam as suas toxinas diretamente no citosol das células hospedeiras (TOMÁS, 2012) e têm sido frequentemente associados com *Aeromonas* (PARKER; SHAW, 2011).

Os T2SS, T3SS e T6SS desempenham papel relevante na virulência de *Aeromonas*. O T2SS está presente em todas as estirpes de *A. hydrophila* pesquisadas e participa da secreção de vários fatores de virulência, incluindo a enterotoxina Act, que

possui capacidade de causar lesão tecidual e diarreia (RASMUSSEN-IVEY et al., 2016).

O T3SS possui uma estrutura complexa, formada por várias subunidades, dentre as quais 20 proteínas são estruturais e as demais auxiliares no processo de secreção (COBURN et al., 2007). Formado por uma estrutura basal, ancorada nas membranas bacterianas, que sustenta o injectissomo ou “complexo agulha”. Geralmente é induzido após contato com as células hospedeiras e tem um papel crucial na interação patógeno-hospedeiro, permitindo a translocação de proteínas efetoras bacterianas entre três membranas (duas bacterianas e uma eucariótica) em uma única etapa e a liberação de determinantes de virulência diretamente no citoplasma da célula hospedeira, interferindo e alterando seus processos fisiológicos (CORNELIS, 2006; MÜLLER; BROZ; CORNELIS, 2008; TOMÁZ, 2012; RASMUSSEN-IVEY et al., 2016).

O T6SS é um dispositivo perfurante com estrutura semelhante a uma cauda de bacteriófagos invertida presente nas membranas de muitas bactérias gram-negativas e está envolvido na interação patógeno-hospedeiro, auxilia na adaptação ao ambiente e promove a infecção (SUAREZ et al., 2008; 2010; CIANFANELLI et al., 2016). Transloca múltiplas proteínas efetoras letais nas células alvo eucarióticas ou bacterianas de forma dependente de contato e de uma estrutura contrátil tipo bacteriófago para expelir os efetores (CIANFANELLI et al., 2016). É codificado em agrupamentos gênicos variáveis que codificam 13 proteínas essenciais para o aparato de secreção além de proteínas acessórias (SUAREZ et al., 2008; BOYER et al., 2009; CIANFANELLI et al., 2016).

2.2.4.4 Adesinas

A capacidade da bactéria aderir à mucosa dos hospedeiros é uma etapa crítica no processo de infecção. Em *Aeromonas* duas classes de adesinas, moléculas que permitem que as bactérias se liguem a receptores específicos na superfície das células eucarióticas, foram descritas: as adesinas fimbriais, associadas a estruturas filamentosas, e as não-fimbriais, associadas a proteínas da membrana externa (TOMÁZ, 2012). As primeiras são melhores estudadas.

As adesinas fimbriais ou filamentosas, denominadas pili/fimbrias, são estruturas proteicas formadas por subunidades de pilina presentes na superfície bacteriana.

Embora sejam organelas adesivas, podem desempenhar outras funções tais como ligação a fagos, transferência de material genético durante a conjugação, formação de biofilme, agregação de células, aderência e invasão de células hospedeiras (PROFT; BAKER, 2009).

Foram descritos, em espécies de *Aeromonas* associadas à gastroenterite, dois tipos de pili longos, flexíveis e ondulados cuja sequência de aminoácidos indica que pertencem à família de pili tipo IV: *bundle-forming pili* (Bfp), também denominado *mannose-sensitive hemagglutinin* (Msh), e o pili tipo IV (Tap) (BARNETT et al., 1997). Pili do tipo Bfp estão envolvidos na adesão às células intestinais, na aderência e formação de biofilmes de *A. veronii* (HADI et al., 2012). Pili do tipo Tap diferem dos primeiros nas suas sequências N-terminais e pesos moleculares (BARNETT et al., 1997) e não parecem ter um papel significativo na colonização intestinal por *Aeromonas*, diferentemente do observado para Bfp cuja remoção resulta em redução de cerca de 80% na adesão às células intestinais (KIROV et al., 1999, 2000).

2.2.4.5 Flagelos

A motilidade confere uma vantagem a sobrevivência das bactérias, permitindo que respondam a condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis e na competição com outros micro-organismos (MERINO et al., 2006). A motilidade decorrente da expressão dos flagelos auxilia a bactéria nos processos de adesão, colonização e invasão das células hospedeiras e formação de biofilme (GAVÍN et al., 2002; KIROV et al., 2002; 2004; GRIM et al., 2014).

Dois tipos de flagelos foram descritos em *Aeromonas*, o flagelo polar e os flagelos laterais. O flagelo polar é constitutivo e responsável pela motilidade em meios líquidos (*swimming*). Os flagelos laterais, presente somente em algumas estirpes, são expressos em meios sólidos, sendo responsáveis pela motilidade em superfície (*swarming*) (KIROV et al., 2002; 2004).

O flagelo polar tem um papel importante na adesão inicial de bactérias a células do epitélio gastrointestinal, enquanto o flagelo lateral aumenta a adesão celular (KIROV et al., 2003, 2004).

2.2.4.6 Enterotoxinas

Toxinas com atividades hemolíticas, citotóxicas e enterotóxicas foram descritas em diferentes espécies de *Aeromonas* (CHOPRA; HOUSTON, 1999; WANG et al., 2003).

As enterotoxinas citotóxicas provocam a degeneração de criptas e microvilosidades do intestino delgado e consequente resposta inflamatória, e aumentam a secreção de fluido. Essas toxinas apresentam atividade hemolítica, enterotóxica e citotóxica (CHOPRA; HOUSTON, 1999; TOMÁS, 2012). Estirpes produtoras de enterotoxinas citotóxicas geralmente são isoladas de pacientes com diarreia (ASAO et al., 1984; CHOPRA; HOUSTON, 1999).

As enterotoxinas citotônicas, como Alt e Ast, diferentemente das citotóxicas, não degeneram o epitélio intestinal, mas provocam secreção de água e eletrólitos pelas células intestinais (CHOPRA; HOUSTON, 1999).

Estudo realizado com o objetivo de analisar individualmente a função das três enterotoxinas de *A. hydrophila* no trato gastrointestinal de ratos, revelou que a enterotoxina citotóxica Act promoveu uma maior resposta na liberação de fluidos, seguida por Alt e Ast; sugeriu também que *in vivo* estas enterotoxinas possam interagir entre si resultando em alteração na liberação de fluidos (SHA et al., 2002).

2.2.4.7 Hemolisinas

Estirpes de *Aeromonas* produzem duas classes de hemolisinas sem propriedades enterotóxicas, as α -hemolisinas e as β -hemolisinas. As primeiras são secretadas durante a fase estacionária e causam lise incompleta, reversível, dos eritrócitos. As β -hemolisinas, mais importantes para a virulência de *Aeromonas*, são produzidas na fase exponencial de crescimento, causando lise e destruição completa dos eritrócitos pela formação de poros na membrana celular (GALINDO et al., 2006).

Embora vários tipos de β -hemolisinas tenham sido descritos, três estão melhor caracterizadas: a aerolisina (aerA), a enterotoxina citolítica (Aer) e a hemolisina (HlyA) (JANDA; ABBOTT, 2010).

2.2.4.8 Outras enzimas extracelulares

Aeromonas spp. também podem secretar uma ampla gama de enzimas extracelulares, incluindo proteases, amilases, lipases, quitinases, nucleases e gelatinases (TOMÁS, 2012). As proteases causam lesão tecidual, auxiliando na invasão e estabelecimento da infecção, superando as defesas do hospedeiro e fornecendo nutrientes para a proliferação bacteriana (PEMBERTON et al., 1997).

Um exemplo de protease é a serina protease de *A. sobria* que através da ativação do sistema calicreína/cinina, induz o extravasamento vascular e, presumivelmente, causa edema e choque séptico; também produz um distúrbio da coagulação sanguínea pela geração de α -trombina e degradação do fibrinogênio, que ocorre na coagulação intravascular disseminada, uma das principais complicações da sepse; também libera anafilatoxina C5a que induz o recrutamento de neutrófilos e liberação de superóxido, degranulação de mastócitos, que estão associados com a formação de pus, lesão tecidual e diarreia, respectivamente, sendo considerado como um fator de virulência com múltiplas ações (IMAMURA; MURAKAMI; NITTA, 2017).

As lipases ou triacilglicerol hidrolases desempenham um importante papel na patogênese pois podem proporcionar nutrientes e atuar como fatores de virulência ao interagir com leucócitos humanos, afetando funções do sistema imunitário através da atividade lipolítica (PEMBERTON et al., 1997; MERINO et al., 1999).

2.2.5 Identificação de *Aeromonas*

Aeromonas spp. crescem rapidamente em meios laboratoriais básicos, como ágar infusão de coração, MacConkey, CLED, ágar sangue, entre outros. Entre as espécies isoladas de humanos, mais de 90% produzem hemólise em ágar sangue de carneiro, com exceção de *A. trota* e *A. popoffii* (0% e 50%, respectivamente). São capazes de oxidar e fermentar glucose, frutose, maltose e trealose, com produção de ácido e gás. As espécies deste gênero (com exceção do *A. schubertii*) são consideradas indol positivo, mas em especial *A. caviae*, pode permanecer negativo após sete dias, mesmo utilizando a extração com xileno. Possuem a capacidade de produzir uma série de exoenzimas

(amilase, protease, fosfolipase e Dnase) e apresentam resistência ao agente vibriostático O/129 (JANDA; ABBOTT, 2010; PARKER; SHAW, 2011).

Para diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* são necessárias várias provas bioquímicas, e mesmo assim isso nem sempre é possível (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003). Uma das maiores dificuldades na identificação de bactérias do gênero *Aeromonas* ao nível de espécie é o contínuo número de espécies novas reconhecidas, tornando a taxonomia do gênero complexa e marcada por confusão e controvérsia (SAAVEDRA et al., 2006) e apesar dos testes fenotípicos usados para identificação serem os mesmos em diversos estudos, as condições de crescimento, meios, inoculação e incubação variam consideravelmente, afetando resultados. Outro fator preocupante é que os esquemas bioquímicos atualmente utilizados nos laboratórios clínicos foram desenvolvidos antes da descrição de novos grupos taxonômicos (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003).

Sistemas comerciais têm sido utilizados para a identificação de *Aeromonas*, mas identificações errôneas têm sido relatadas (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; SUREK et al., 2010; LAMY et al., 2010).

Uma alternativa para a identificação de *Aeromonas* é a utilização de ensaios moleculares, que permitem uma identificação mais refinada das espécies, destacando discrepâncias na identificação bioquímica dos isolados ambientais e clínicos (PUTHUCHEARY; PUAH; CHUA, 2012). As técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para superar os problemas apresentados na identificação bioquímica, porém limitações nestas técnicas também ocorrem. Como exemplo, muitas das sondas de DNA específicas para *Aeromonas* têm um espectro estreito que permite a identificação de apenas uma única espécie (PARKER; SHAW, 2011).

O sequenciamento do gene 16S rRNA, técnica mais utilizada para a identificação molecular de gênero e espécie de bactérias, não apresenta discriminação adequada para o gênero *Aeromonas* devido à heterogeneidade intra-genômica observada nos operons de 16S rRNA, cuja frequência de polimorfismos varia de 0,06 a 1,5% (MORANDI et al., 2005; ALPERI et al., 2008; MARTINO et al., 2011). O ensaio de 16S *Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) também foi aplicado à identificação de espécies de *Aeromonas* (BORREL; FIGUERAS; GUARRO, 1998). No entanto, padrões atípicos de 16S RAPD-PCR foram descritos em uma mesma espécie (ALPERI et al., 2008; PUTHUCHEARY et al., 2012) e

posteriormente, com a descrição de *A. dhakensis* (*A. aquariorum*), o compartilhamento de um mesmo perfil entre esta e *A. caviae* (PUTHUCHEARY et al., 2012) trazendo incertezas na identificação destas bactérias.

O sequenciamento dos genes *rpoD* e *gyrB* também têm sido utilizados para a identificação de *Aeromonas* e permitem melhor discriminação das espécies (PARKER; SHAW, 2011). A espectrometria de massa foi aplicada à identificação de *Aeromonas* e apresentou precisão de 100% na identificação a nível de gênero e 91,4% ao nível de espécie em comparação ao sequenciamento de *rpoD* (LAMY et al., 2011).

Com o desenvolvimento e disponibilidade de novos métodos de sequenciamento, a análise genômica vem sendo amplamente aplicada em microbiologia clínica no estudo dos patógenos humanos, aumentando o conhecimento sobre as doenças infecciosas (KWONG et al., 2015). Atualmente, existem quatro principais aplicações potenciais do sequenciamento de genoma para caracterização de patógenos bacterianos no laboratório de microbiologia diagnóstica: identificação, tipagem, detecção de resistência e de genes de virulência (KWONG et al., 2015).

O primeiro genoma completo de *Aeromonas*, publicado em 2006, caracterizou as vias metabólicas e identificou diversos genes de virulência da estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966^T, originalmente isolada de “uma lata de leite com odor de peixe” (SESHADRI et al., 2006). Nos últimos 13 anos diversos genomas de *Aeromonas* foram sequenciados e publicados (Tabela 1), aumentando o conhecimento sobre essas bactérias, permitindo também a identificação de outros genes de virulência (SESHADRI et al., 2006; REITH et al., 2008) e revelando que a distribuição desses genes é heterogênea entre as estirpes (GRIM et al., 2014). Várias espécies estão representadas, particularmente *A. hydrophila* e *A. caviae* (GRIM et al., 2014), enquanto que os genomas publicados de *A. veronii* são provenientes somente de amostras ambientais.

TABELA 1. GENOMAS DE *Aeromonas* SEQUENCIADOS E PUBLICADOS

(continua)

Espécie	Referência
<i>A. aquariorum</i>	WU et al., 2012.
<i>A. caviae</i>	BEATSON et al., 2011; CHAN et al., 2015; MORIEL et al., 2015; PADILLA et al., 2015; CARDOZO et al., 2016.
<i>A. bestiarum</i>	KUMRU et al., 2018.
<i>A. hydrophila</i>	SESHADRI et al., 2006; HAN et al., 2013; GRIM et al., 2014; PRIDGEON; ZHANG; ZHANG, 2014; PANG et al., 2015; FORN-CUNÍ; TOMÁS; MERINO, 2016; TEKEDAR et al., 2013; HONEIN et al., 2018.

(conclusão)

<i>A. lusitana</i>	COLSTON et al., 2018.
<i>A. media</i>	CHAI; WANG; CHEN, 2012.
<i>A. veronii</i>	LI et al., 2011; BOMAR et al., 2013; KANG et al., 2016; TEKEDAR et al., 2016; JAGODA et al., 2017.
<i>A. salmonicida</i>	REITH et al., 2008; CHARETTE et al., 2012; PAVAN et al., 2013; VALDES et al., 2015; ABDELHAMED; LAWRENCE; PFEIFFER et al., 2018; VINCENT et al., 2015; VINCENT; CHARETTE, 2018; WALDBIESER, 2019.
<i>A. taiwanensis</i>	WANG et al., 2014.

2.2.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos entre os patógenos entéricos é um problema nos países em desenvolvimento, onde existe uma elevada frequência de doença gastroentérica e muitos antibióticos são usados inadequadamente. A resistência aos antibióticos é particularmente relevante em espécies patogênicas do gênero *Aeromonas* em que, além da resistência aos antibióticos β -lactâmicos clássicos, mediada por β -lactamases, a resistência múltipla tem sido frequentemente identificada (GUERRA et al., 2007; PARKER; SHAW, 2011).

Em relação à resistência intrínseca, são descritos cinco fenótipos básicos de acordo com o tipo de β -lactamase produzido em relação à espécie ou ao grupo de espécies. Os fenótipos se baseiam na possível produção de uma a três β -lactamases das classes B, C ou D. As três β -lactamases são induzíveis e a expressão pode ser muito baixa, estritamente dependente das condições de cultura (FOSSE, 2010).

O fenótipo penicilinase é devido a uma β -lactamase classe D (oxacilinase) produzida por todas as espécies de *Aeromonas*, exceto *A. trola*. Geralmente é altamente expressa e confere resistência à ticarcilina (MIC > 256 $\mu\text{g/ml}$). É fracamente inibida pelo ácido clavulânico e tazobactam (FOSSE, 2010). O fenótipo cefalosporinase é devido a produção de uma β -lactamase tipo cefalosporinase da classe C, que confere resistência à cefalotina (MIC > 256 $\mu\text{g/ml}$). A produção apenas desta β -lactamase foi associada com *A. trola* (FOSSE, 2010).

O fenótipo penicilinase-cefalosporinase caracteriza-se pela resistência à amoxicilina, ticarcilina, cefalotina e, às vezes, à cefoxitina. É encontrado em espécies do complexo *A. caviae*. O fenótipo penicilinase-carbapenemase apresenta resistência à amoxicilina e ticarcilina, imipenem-intermediário e suscetibilidade à cefalotina. É encontrado no complexo *A. veronii*, cujas cepas produzem uma oxacilinase que confere

o perfil penicilinase, e uma carbapenemase de espectro muito estreito que hidroliza principalmente o imipenem. Esta carbapenemase é uma β -lactamase da classe B e confere resistência de baixo nível. Já o fenótipo penicilinase-cefalosporinase-carbapenemase é encontrado no complexo *A. hydrophila* e as estirpes são resistentes à amoxicilina, ticarcilina e cefalotina (FOSSE, 2010).

Em ampla revisão, Janda e Abbot (2010) descreveram o perfil de suscetibilidade geral do gênero *Aeromonas* a classes de antibióticos específicos, destacando como mais comum a resistência aos antifolatos, cefalosporinas de espectro estreito, penicilinas e macrolídeos. Também descrevem a resistência, em menor frequência, aos aminoglicosídeos e cefalosporinas de amplo espectro. No entanto, este quadro deve ser visto apenas como uma base geral para o gênero, uma vez que as porcentagens de resistência a drogas podem variar significativamente dentro de cada uma das espécies, localidades geográficas ou devido a pressões de seleção ambiental.

2.3 RESISTÊNCIA À BILE

Para patógenos entéricos, a capacidade de se adaptar a inúmeros fatores do hospedeiro é fundamental para estabelecer infecção. Para sobreviver no trato gastrointestinal, os micro-organismos precisam resistir a inúmeras condições ambientais extremas, incluindo variações no pH, com o ácido gástrico no estômago, baixos níveis de oxigênio, limitação de nutrientes, elevada osmolaridade e a bile no intestino delgado, que constituem potenciais barreiras para a sua sobrevivência (BEGLEY; GAHAM; HILL, 2005; SISTRUNK et al., 2016).

A bile é uma secreção digestiva importante para a emulsificação e digestão de lipídeos, cuja composição é pobre em proteínas e rica em lipídios, incluindo colesterol, fosfolipídios e ácidos biliares (GUNN, 2000).

Os ácidos biliares são os principais componentes da bile, são sintetizados a partir do colesterol e conjugados com glicina ou taurina no fígado e armazenados na vesícula biliar antes da secreção no duodeno, através do ducto biliar comum (LI; CHIANG, 2015).

No fígado são sintetizados os dois primeiros ácidos biliares, ácido cólico e ácido quenodesoxicólico. Os sais biliares são mantidos em altas concentrações no duodeno, jejuno e íleo proximal para solubilizar lipídeos e vitaminas lipossolúveis permitindo sua

digestão e absorção. No intestino delgado, as bactérias comensais anaeróbias obrigatórias e as facultativas metabolizam os sais biliares, resultando na produção dos sais biliares secundários, ácidos desoxicólico e litocólico. No íleo distal, os sais biliares são absorvidos na corrente sanguínea, complexados às proteínas plasmáticas e retornam ao fígado (BEGLEY; GAHAM; HILL, 2005; SISTRUNK et al., 2016).

Nos seres humanos, desoxicolato de sódio (DOC), quenodesoxicolato (NaCDC), ursodesoxicolato (NaUDC) e glicocolato (NaGIC) são os sais biliares mais importantes presentes no intestino, sendo o DOC aquele encontrado em maior concentração na água fecal (87-247 μM) (VAN FAASSEN et al., 1993; BERNSTEIN et al., 1999). A concentração de sais biliares no intestino delgado varia, dependendo do indivíduo e tipo e quantidade de alimento ingerido, de aproximadamente 0,2 a 2% (p/v) (DAWSON, 1998, citado por KRISTOFFERSEN et al., 2007); segundo DEEST e colaboradores (1968) de 1,9 a 5,9 mg/mL; e conforme Northfield e McCOLL (1973), a concentração média, pós-prandial, dos ácidos biliares totais no intestino delgado varia de 2 mM a 10 mM, dependendo sítio analisado, e a concentração de ácidos biliares livres de 0,25 mM a 1 mM ($\mu\text{mol/mL}$).

Devido à natureza lipofílica do anel esteroide, os sais biliares atuam como detergentes na digestão de gorduras, com a capacidade de afetar fosfolípidios e proteínas de membranas celulares, perturbando a homeostase celular e atuando como potente antimicrobiano. Deste modo, a tolerância de agentes patogênicos à bile é importante para a sua sobrevivência e subsequente colonização do trato gastrointestinal (GUNN, 2000; BEGLEY; GAHAM; HILL, 2005; BUSTOS et al., 2018).

As bactérias monitoram continuamente os parâmetros ambientais durante a colonização ou infecção do hospedeiro expressando genes que ajudam na sua sobrevivência e reprimindo aqueles que são desnecessários. Vários patógenos entéricos utilizam a bile como um sinal para regular a expressão de genes de virulência para colonizar ou manter a infecção no trato gastrointestinal humano. Considerando a natureza complicada do estresse causado pela bile e sais biliares, a tolerância de um organismo a esses compostos presumivelmente requer diferentes mecanismos de defesa e um amplo número de proteínas, incluindo muitas que controlam a arquitetura do envelope celular ou a manutenção da homeostasia intracelular. Proteínas que captam ou expulsam bile, ou enzimas que modificam e transformam os sais biliares também

desempenham papéis importantes na resistência à bile (BEGLEY; GAHAM; HILL, 2005).

Para patógenos que colonizam o intestino delgado, a resistência à bile é fundamental para garantir a sobrevivência a longo prazo no hospedeiro. Estudos realizados em *Escherichia coli* indicam que os ácidos biliares induzem a expressão de genes específicos em resposta a perturbação da membrana, ao estresse oxidativo e danos no DNA. A expressão de genes de resposta ao estresse pode também promover a interação de *E. coli* com as células do epitélio do cólon (BERNSTEIN et al., 1999). Estudo sobre o impacto do estresse causado por exposição a baixo pH e aos sais biliares em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) mostrou um significativo aumento da adesão de EPEC às células hospedeiras (JESUS et al., 2005), etapa fundamental na colonização.

Em *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7, a exposição aos sais biliares levou ao aumento da expressão dos genes que codificam o sistema de efluxo AcrAB RND que bombeia bile para fora da célula, e é um componente crucial da resistência à bile também em *E. coli* K-12 e *Salmonella* Typhimurium. Genes *basRS/pmrAB* codificando o sistema de transdução de sinal de dois componentes, que detectam e respondem a sinais ambientais produzindo alterações fisiológicas na bactéria, também tiveram a expressão aumentada. *basR* controla a expressão do operon *arnBCADTEF* que juntamente com *ugd* é responsável pela síntese e transferência de 4-amino-4-deoxiL-arabinose ao lipídeo A, ambos tiveram sua expressão aumentada indicando que a resposta os sais biliares causou modificação do lipídeo A. Além disso, o tratamento de EHEC com os sais biliares gerou resistência à polimixina (KUS et al., 2011).

Prouty e colaboradores (2004) verificaram que a interação de *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium com o DOC resulta no aumento da resistência à bile e a outros agentes antimicrobianos. Em *Salmonella enterica*, alterações na estrutura do peptidoglicano foram detectadas na presença de uma concentração sub-letal de DOC (HERNÁNDEZ et al., 2015).

O crescimento de *Shigella* spp. na presença dos sais biliares desoxicolato ou quenodesoxicolato aumentaram a invasão bacteriana a células HeLa. No entanto, o crescimento na presença de outros sais biliares teve pouco ou nenhum efeito. O fator de virulência requerido para a adesão induzida não foi identificado neste estudo, no entanto, os autores acreditam que o T3SS foi exigido (POPE; REED; PAYNE, 1995). A

exposição prolongada de *S. flexneri* a sais biliares levou à formação de biofilme e aumento de aderência a células HT-29 (NICKERSON et al., 2017).

Os efeitos dos ácidos biliares conjugados, ácido glicocólico e ácido taurocólico na produção de hemolisina termoestável por *Vibrio parahaemolyticus* foram determinados por Osawa e Yamai (1996), que observaram que a quantidade da hemolisina foi de 04 a 16 vezes maior no meio contendo os ácidos biliares do que o excretado no meio sem os ácidos.

O aumento significativo da motilidade, com redução concomitante na síntese de toxina colérica na presença de bile foi observado em *V. cholerae* (GUPTA; CHOWDHURY, 1996). Em estudo realizado com *V. cholerae* pertencente ao sorogrupo O39, verificou-se que tanto a bile quanto o desoxicolato induziram a expressão dos genes codificadores do T3SS, incluindo os genes reguladores do tipo ToxR, vttRA e vttRB, que são essenciais para a virulência (ALAM et al., 2010).

Esses dados mostram que a resposta ao estresse causado pela bile é complexa e que diferentes mecanismos de defesa podem ser utilizados pelos micro-organismos. A resposta de *Aeromonas* aos sais biliares ainda não é conhecido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar características de virulência associadas com *A. veronii* bv sobria 312M e verificar a resposta da bactéria ao sal biliar desoxicolato de sódio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

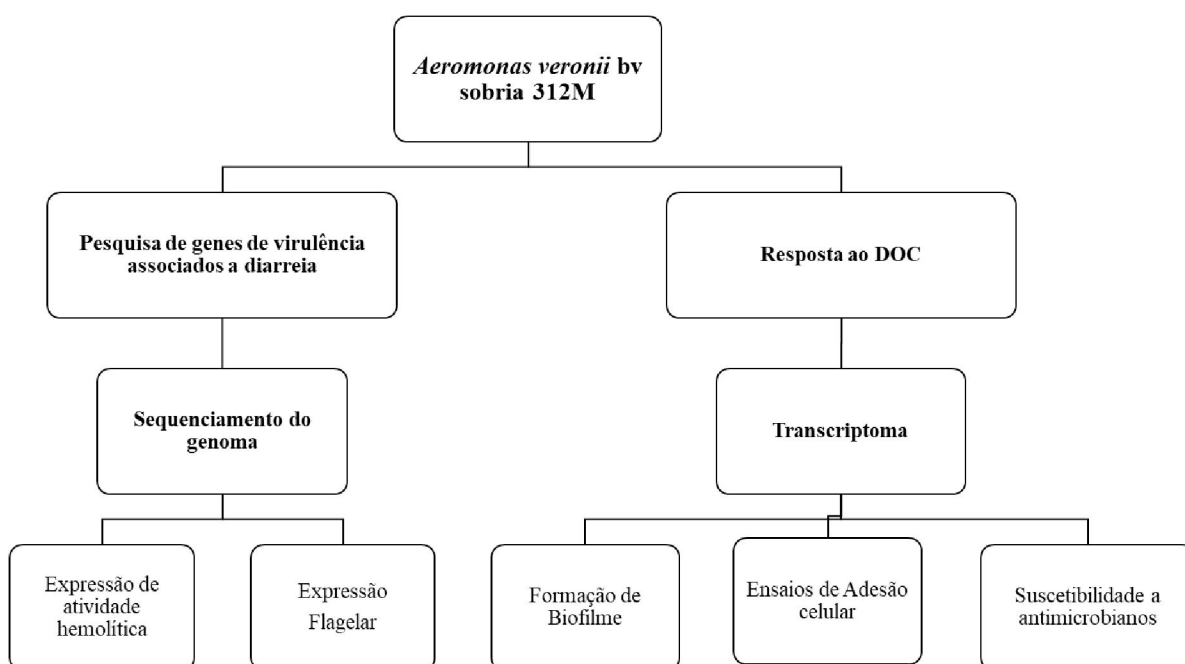
- Identificar genes potencialmente associados com virulência e resistência aos antibióticos no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M;
- Verificar a expressão de possíveis genes de virulência e resistência através de testes fenotípicos;
- Analisar a resposta de *A. veronii* bv sobria 312M frente ao desoxicolato de sódio (DOC), através da identificação de genes diferencialmente expressos na presença e ausência deste sal biliar;
- Verificar se a interação com o DOC afeta a capacidade de adesão celular de *A. veronii* bv sobria 312M;
- Averiguar potenciais efeitos do DOC sobre a capacidade de *A. veronii* bv sobria 312M formar biofilme;
- Comparar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos na presença e na ausência de DOC em diferentes estirpes de *Aeromonas*.
- Comparar o perfil de proteínas expressas na presença e na ausência de DOC em diferentes estirpes de *Aeromonas*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia utilizada para alcançar os objetivos propostos envolveu o sequenciamento do genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, a obtenção do transcriptoma da bactéria crescida na presença e na ausência de DOC, e a realização de testes *in vitro* (Figura 1).

Para comparar o perfil de proteínas expressas foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os procedimentos adotados estão descritos a seguir.

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS.



FONTE: O Autor (2019).

4.1 BACTÉRIAS ESTUDADAS

As bactérias estudadas nas análises fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica do departamento de Análises Clínicas da UFPR, e foram mantidas em meio Cary-Blair, sob refrigeração. As estirpes e sua origem estão descritas na tabela 2.

TABELA 2. INFORMAÇÕES SOBRE AS BACTÉRIAS ESTUDADAS

Gênero/espécie/biovariedade	Estirpe	Origem/Fonte
<i>Aeromonas veronii</i> bv sobria	312M	Fezes; Surek et al., 2010.
<i>A. caviae</i>	8LM	Fezes; Assis et al., 2014.
<i>A. caviae</i>	359M	Fezes; Surek et al., 2010.
<i>A. hydrophila</i>	44	Fezes; Vizzotto, 2009.
<i>A. hydrophila</i>	27LM	Fezes; Assis et al., 2014.
<i>A. hydrophila</i>	LOC81	Fezes; Prediger et al., 2012.
<i>A. trota</i>	2	Fezes; Vizzotto, 2009.
<i>A. trota</i>	7	Fezes; Vizzotto, 2009.
<i>A. trota</i>	LCR1999	Líquido cefaloraquidiano; Vizzotto, 2009.
<i>A. veronii</i> bv sobria	49H	Sangue; Vizzotto, 2009.
<i>A. veronii</i> bv sobria	55M	Fezes; Surek et al., 2010.

FONTE: O Autor (2019).

NOTA: Exceto por *A. veronii* bv sobria 312M, as outras bactérias foram utilizadas somente para avaliação do efeito do DOC sobre o perfil de suscetibilidade a antibióticos e perfil proteico.

4.2 TESTES *IN VITRO*

4.2.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica de *A. veronii* bv sobria 312M foi determinada realizando-se o cultivo da bactéria em ágar tripticaseína de soja (TSA; Becton e Dickinson) acrescido de 5% de sangue de carneiro (Newprov) incubado a 37°C por aproximadamente 18h.

4.2.2 Ensaios de adesão e viabilidade celular

Para os ensaios de adesão foi adotado o procedimento descrito por Jesus et al. (2005), com algumas modificações. *A. veronii* bv sobria 312M foi crescida em meio TSA, incubado à 37°C por aproximadamente 18h. Então, colônias isoladas foram inoculadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Himedia), que foi incubado a 37°C por aproximadamente 18h. Após, uma alíquota do cultivo foi utilizada para preparo de uma suspensão 1:10, também em BHI, e esta foi incubada a 37°C até obtenção de uma densidade ótica (DO₆₀₀) 0,3. Em seguida, 5mL dessa suspensão foram transferidas para quatro tubos tipo Falcon de 15mL estéreis e a dois deles adicionou-se volume de DOC para obter concentração final de 0,1% (teste); aos outros dois adicionou-se igual volume de água (controles). Um par de tubos controle e contendo DOC 0,1% foi incubado por 60 minutos a 37°C, e o outro par por 90 minutos. Após a incubação, as suspensões

foram diluídas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sem antibiótico para obtenção de uma suspensão com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland.

Em placas de 96 poços, $2,0 \times 10^4$ células da linhagem HeLa foram mantidas em DMEM com soro de vitelo fetal 10% (FCS) e 0,1% de gentamicina, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Então, para o ensaio de adesão as células foram infectadas respectivamente, com 100 µL de suspensões contendo 10^7 e 10^6 bactérias em DMEM sem antibióticos. As placas foram incubadas por 2h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, bactérias não aderidas foram removidas por 3 lavagens com PBS estéril, e as células contendo bactérias aderidas foram lisadas e ressuspensas em 100 µL de água estéril. Um volume de 50 µL da suspensão foi adicionada a 450 µL de água estéril, e a partir desta foram realizadas diluições sucessivas para a quantificação de bactérias aderidas às células. Um volume de 100 µL das diluições foi inoculada em ágar nutriente, e após a incubação a 37°C por 18h o número de colônias foi determinado por ensaio de contagem em placa.

A viabilidade das células Hela foi avaliada pelo método de Kueng, Silber e Eppenberger (1989). O procedimento foi o mesmo descrito acima exceto pela etapa de lise celular. Após a remoção das bactérias não aderidas pelas lavagens com PBS estéril, foi adicionado meio DMEM e as placas foram incubadas por 2h ou 24 h. Após esse período as placas foram novamente lavadas com PBS e as células foram fixadas com metanol por 10 min. Em seguida foram coradas com cristal violeta 0,2% por 3 min. Os poços foram lavados com PBS até remoção do excesso do corante e tratados com a solução de citrato de sódio 0,05 M. A absorbância foi medida em leitora de microplaca ThermoFischer Multiskan FC no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes em triplicata.

4.2.3 Motilidade *swimming* e *swarming*

Os ensaios de motilidade do tipo *swimming* e *swarming* foram realizados segundo Grim e colaboradores (2014), exceto que para o teste de *swarming* foi adicionado tween 80/0,005% (v/v) ao meio LB (Shaw, comunicação pessoal). Para o ensaio de *swimming*, *Aeromonas veronii* bv sobria 312M foi inoculada no centro de uma placa, contendo meio LB com 0,3% de ágar, através de uma picada no meio com

auxílio de agulha bacteriológica. Ao completar 24h de incubação, as amostras foram analisadas para a presença de *swimming* através da distância de migração no meio. Como controle positivo de *swimming* foi utilizado *P. mirabilis* ATCC® 25933™. Após essa etapa, a estirpe foi inoculada em meio LB contendo 0,5% de ágar para a realização dos ensaios de *swarming*. A inoculação foi realizada centralmente na superfície do meio utilizando o crescimento bacteriano mais externo do teste de *swimming*. Como controle positivo para *swarming* foi utilizado *P. mirabilis* ATCC® 25933™ e como controle negativo *A. hydrophila* ATCC®7966™. A bactéria foi avaliada para presença ou ausência de *swarming* em 18h e em 24h de incubação.

4.2.4 Capacidade de formar biofilme

Para determinar a capacidade de formar biofilme, *A. veronii* bv sobria 312M foi cultivada em ágar nutriente a 37°C por aproximadamente 18h e então colônias isoladas foram utilizadas para preparar suspensões com densidade ótica (DO 500 nm) de 0,5 em caldo LB com e sem DOC 0,1%. Um volume de 200 µL dessas suspensões foi transferido para tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e incubados a 36°C por 24h. O sobrenadante foi retirado e após lavagens com água, adicionou-se 200 µL cristal violeta 1% para coloração do biofilme aderido à parede do tubo. Após 15 minutos a temperatura ambiente, os tubos foram lavados, secos e então foi adicionado 200 µL de etanol absoluto para solubilizar o corante. O conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços e o biofilme foi quantificado pela leitura espectrofotométrica a 570nm. Foram realizados 03 experimentos independentes em triplicata. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ foi o controle positivo e tubos contendo apenas o meio de cultura o controle negativo.

4.2.5 Perfil de suscetibilidade aos antibióticos

As estirpes de *Aeromonas* foram cultivadas em TSA a 37°C por 18h. Então colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo solução salina (NaCl 0,9%) estéril, até a obtenção de uma suspensão com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL). Em seguida as suspensões bacterianas foram inoculadas, com auxílio de

swabs estéreis, em ágar Muller-Hinton (Oxoid) com e sem adição de DOC 0,1% e os discos de antibióticos foram aplicados utilizando uma pinça estéril. Após 18 horas de incubação a 37°C, o diâmetro dos halos de inibição, em milímetros, foi determinado. Foram testados os seguintes antimicrobianos: Amoxicilina+Clavulanato (AMC) 30 µg, Aztreonam (ATM) 30 µg, Amicacina (AK) 30 µg, Cefoxitina (CFO) 30 µg, Ceftriaxona (CRO) 30 µg, Imipenem (IPM) 10 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Sulfametoxazol+Trimetoprim (SUT) 25 µg, Cloranfenicol (C) 2,6 µg, Ácido nalidíxico (NAL) 30 µg, Tetraciclina (TE) 30 µg e Polimixina (PXB) B 300 UI e tiras de E-test de Colistina. Os resultados foram interpretados de acordo com CLSI (2011) e nota técnica 01/2013 da ANVISA.

4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA GENÔMICO

O cultivo da estirpe *A. veronii* bv sobria 312M foi realizado em ágar nutriente (Merk) incubado a 37°C por aproximadamente 18 horas. As colônias foram analisadas quanto à morfologia colonial e pureza. Uma colônia isolada foi analisada microscopicamente pela coloração de Gram, para confirmação da morfologia e reação tintorial característica de *Aeromonas*, e também quanto à atividade de citocromo oxidase.

4.3.1 Isolamento e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico da bactéria foi purificado utilizando o “High Pure PCR Template Preparation kit” (Roche®) conforme instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada utilizando o kit “Quant-it Pico Green dsDNA assay” (Invitrogen®). O sequenciamento foi realizado em dois sequenciadores que utilizam metodologias distintas, o 454 GS Junior (Roche®) e Illumina Miseq (Illumina).

4.3.2 Sequenciamento no equipamento 454 GS Junior

O sequenciamento no 454 GS Junior foi realizado durante o desenvolvimento do projeto de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. O sequenciamento foi realizado utilizando o método de

shotgun com os kits e reagentes específicos para o equipamento e seguindo todas as orientações preconizadas pelo fabricante. Brevemente, para a construção da biblioteca genômica foram utilizados os kits *GS Rapid Library Prep Nebulizers, GS Rapid Library Reagents, Buffers and Adaptors* (Roche®). Na etapa de amplificação clonal, baseada em PCR em emulsão (emPCR), foi utilizado o *GS Junior emPCR Kit (Lib-L)* (Roche®) e posteriormente, para a recuperação e o enriquecimento das esferas contendo os fragmentos de DNA foi empregado o kit *Bead Recovery Reagents* (Roche). Para o sequenciamento foi utilizado o equipamento 454 *GS Junior System* (Roche®) em combinação com os kits *GS Junior Reagents and Enzymes, GS Junior Titanium Sequencing Kit* (Roche®) e *GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit* (Roche®). A análise dos dados foi realizada com o *software* de processamento de dados GS Data Analysis versão 2.7, o qual se baseia na intensidade do sinal de cada evento de incorporação, em cada poço da placa Pico Titer, para determinar a sequência de todas as leituras paralelamente.

4.3.3 Sequenciamento na plataforma Illumina

O sequenciamento na plataforma Illumina foi realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, utilizando o método de *shotgun* e os reagentes e protocolos recomendados pelo fabricante.

4.3.4 Montagem do genoma

As sequências obtidas no sequenciador 454 GS Jr foram montadas utilizando o *software* Newbler 2.7 (454 *runAssembly software*, versão 1.1.02.15). Para a montagem do sequenciamento realizado na plataforma Illumina, utilizou-se o *software* CLC Main Workbench 6.5.1 (CLC bio, Aarhus, Denmark). Os dados provenientes das primeiras montagens com Newbler e CLC foram submetidos aos *softwares* SPAdes 3.10 (BANKEVICH et al., 2012) e Velvet 1.2.10 (ZERBINO e BIRNEY, 2008). Com a finalidade de melhorar a montagem do genoma, o *software* GFinisher (GUIZELINI et al., 2016; <http://gfinisher.sourceforge.net/>) foi utilizado empregando múltiplos genomas

completos de espécies de *Aeromonas* depositados no NCBI como referência, para fechamento das lacunas e redução do número de contigs.

4.3.5 Average Nucleotide Identity – ANI

Average Nucleotide Identity (ANI) é baseada na similaridade nucleotídica média que os genomas de duas estirpes compartilham. A similaridade média dos genomas representa uma medida robusta da distância genética e evolutiva entre eles, pois compara um grande número de genes conservados. Foi estabelecido um limiar de 95% ou mais de identidade de ANI para dois genomas pertencerem a mesma espécie. Os valores de ANI foram determinados com a calculadora on-line disponível no endereço <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/> (GORIS et al., 2007) utilizando os genomas completos de várias outras espécies de *Aeromonas* depositados no NCBI até dezembro de 2018.

4.3.6 Anotação do genoma

A anotação do genoma de *A. veronii* bv sobria 312M foi realizada com o "Rapid Annotation using Subsystem Technology" (RAST), versão 2.0, um sistema automatizado para a anotação de genomas bacterianos que produz rapidamente e com alta qualidade avaliações de funções dos genes e uma reconstrução metabólica inicial. Baseia as suas tentativas para conseguir precisão, consistência e integridade na utilização de uma biblioteca crescente de subsistemas e famílias de proteínas (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014).

Para a análise das vias metabólicas presentes na estirpe 312M também foi utilizado o banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), que possibilita a compreensão das funções de sistemas biológicos, especialmente conjuntos de dados moleculares de larga escala gerados pelos sequenciamentos de genomas (MORIYA et al., 2007).

4.3.7 Pesquisa de genes associados à virulência e resistência

Foi realizada uma pesquisa manual para verificar a presença no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M de genes já associados à virulência em estirpes de *Aeromonas* (Tabela 3). As sequências dos genes associados com virulências disponíveis na literatura foram comparadas com o genoma de *A. veronii* bv sobria 312M utilizando a ferramenta NCBI BlastP (ALTSCHUL et al., 1990). Para determinar a presença de genes associados à virulência foram considerados alinhamentos com no mínimo 75% de identidade e cobertura.

O *software* ResFinder-2.1 (ZANKARI et al., 2012) foi utilizado para a identificação de genes de resistência a antimicrobianos.

TABELA 3. GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA EM *Aeromonas*
(continua)

Função	Referência
Motilidade e adesão	
Flagelo lateral ^a	Reith et al., 2008
Flagelo polar	
Pilus Tap tipo IV	
Pilus Flp tipo IV	Li et al., 2011
Pilus Msh tipo IV ^a	
Fimbria tipo I	
Fimbrilina	Seshadri et al., 2006
Adesinas	
Toxinas/outros fatores de virulência	
Aerolisina (AerA)	Howard et al., 1987
Enterotoxina citotônica termoestável (Ast)	Seshadri et al., 2006
Enterotoxina citotônica termolábil (Alt)	Chopra et al., 1996
Enterotoxina citotóxica (Act)	
Hemolisina termoestável	Li et al., 2011
Hemolisina, HlyA	
Hemolisina III	
Hemolisina	
Hemolisina extracelular AHH1	
Toxina RTX	
Fosfolipase A1 ^b	
Hialuronidase	
Serina protease	
Protease extracelular (EprA1)	Seshadri et al., 2006
Metaloprotease	
Enolase	
Invasina	
DNA adenina metilase (Dam)	
Glucose-inhibited division protein (GidA)	
Mucin-desulfating sulfatase	
Colagenase	Li et al., 2011

	(conclusão)
Função	Referência
Sistema de secreção	
T2SS	Li et al., 2011
T3SS ^a	Bomar et al., 2013
T6SS ^a	Seshadri et al., 2006
Quorum sensing	
Autoindutor AhyI	
Proteína ativadora transcricional, AhyR	
Sistema QseBC	Seshadri et al., 2006
Ribosil-homocisteína liase, LuxS	
Aquisição de ferro	
Síntese de sideróforos	
Regulador de absorção de ferro (Fur)	Seshadri et al., 2006
Absorção de sideróforos	
Captação do grupo heme	Najimi et al., 2008
Resistência a antibióticos	
Beta-lactamase CphA	
Beta-lactamase ampC	
Beta-lactamase	
Cloranfenicol acetiltransferase	
Cloranfenicol acetiltransferase	Seshadri et al., 2006
Proteína de resistência a biciclomicina	
Proteína de resistência a fosfomicina	
Aminoglicosídeo acetiltransferase	
Aminoglicosídeo fosfotransferase	

4.4 RESPOSTA AO SAL BILIAR DESOXICOLATO DE SÓDIO

4.4.1 Transcriptoma

Para a realização do transcriptoma a estirpe *A. veronii* bv sobria 312M foi crescida em caldo BHI a 37°C por 18 horas. Após esse período alíquota do cultivo foi diluída 1:10 e transferida para novo frasco contendo meio BHI, que foi incubado a 37°C até atingir uma DO₆₀₀ de 0,3. Em seguida, 10 mL da suspensão foram transferidas para tubo de 15mL estéril contendo DOC na concentração final de 0,1% e para outro tubo controle contendo mesmo volume de água. Os tubos foram incubados por 1h a 37°C e após esse período, as bactérias foram submetidas ao isolamento de RNA.

4.4.1.1 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

O RNA da bactéria foi extraído utilizando o “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche®) conforme instruções do fabricante. A quantificação de RNA nas amostras foi realizada nos equipamentos Nanodrop (THERMO Scientifics) e Qubit® 2.0 (Invitrogen). Para a análise da integridade do RNA, 250 ng das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante em tampão borato de

sódio $1\times$ a 60 V durante 30 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz UV, utilizando o sistema UVP Imaging System. Quando atestada a integridade do RNA por eletroforese, as amostras foram também analisadas, utilizando o equipamento Bioanalyser (Agilent Technologies®), uma abordagem mais sensível, para avaliar a integridade, qualidade e quantidade dos RNAs extraídos. Após a confirmação da qualidade das amostras, 1 μ g de RNA purificado das culturas realizadas na presença e ausência de DOC 0,1% foi utilizado para síntese do cDNA, utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems).

4.4.1.2 Sequenciamento do cDNA da estirpe *A. veronii* bv sobria 312M

O sequenciamento do cDNA foi realizado na plataforma Ion Proton™ System no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, utilizando os reagentes e protocolos indicados pelo fabricante.

4.4.1.3 Avaliação da qualidade das sequências

A qualidade das sequências foi avaliada usando a ferramenta CLC Main Workbench 6.5.1 (CLC bio). Os resultados das análises fornecidos continham as estatísticas básicas das sequências, como o número e o tamanho das leituras geradas, o conteúdo GC das sequências e a distribuição de valores de qualidade para cada uma das bases das sequências.

4.4.1.4 Análise da expressão gênica

O programa DESeq foi utilizado para identificar genes diferencialmente expressos. DESeq2 1.0.1742, desenvolvido em linguagem R se baseia no princípio de que a contagem de leituras que se encontram associadas a uma classe está linearmente relacionada à abundância dessa classe. Além disso, realiza testes estatísticos para verificar se o efeito de diferentes condições biológicas sobre a contagem de leituras ocorreu ou não ao acaso (ANDERS; HUBERS, 2009).

O *software* utiliza uma tabela de contagem de transcritos (gerada pelo programa HTSeq) para descobrir diferenças quantitativas nos níveis de expressão entre os grupos experimentais. Os valores de p foram obtidos pelo teste exato de Fisher (ANDERS; HUBERS, 2009).

O pacote DESeq informa o valor da razão de expressão (*fold-change*) em logaritmo de base 2 ($\log_2 \text{fold-change}$) de uma condição em relação à outra. *Foldchange* é a razão entre uma condição final (teste) e a sua condição inicial (controle), $FC = \text{teste}/\text{controle}$. Assim, se a expressão na condição teste for maior que aquela da condição controle, *fold-change* será maior que 1 ($FC > 1$). Se a condição controle for maior que a teste, *fold-change* será menor que 1 ($FC < 1$). Neste estudo, foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles cujo $\log_2 \text{fold change}$ foi ≥ 2 e ≤ -2 e somente os resultados com significância estatística (p-valor) menor que 0,05.

4.4.1.5 Validação do perfil de expressão gênica por Reação da Polimerase em Cadeia Quantitativa (qPCR)

4.4.1.5.1 Desenho dos iniciadores

A partir das sequências dos genes de interesse identificados, foram desenhados iniciadores específicos para cada sequência utilizando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os iniciadores passaram por diversos testes *in silico* para a comprovação de sua eficiência, sendo submetidos ao programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) que tem por finalidade a análise de outros fatores, como o dobramento de iniciadores (*Hairpin*), formação de dímeros e análise de estrutura secundária. Esta análise pode revelar possíveis problemas que os iniciadores teriam caso fossem escolhidos para a reação de PCR. Os *primers* projetados também foram avaliados através de uma simulação de PCR *in silico* com auxílio do programa FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>; KALENDAR et al., 2017).

4.4.1.5.2 O isolamento de RNA e síntese de cDNA

Foram realizados de acordo como descrito nos itens 4.4.1.1.

4.4.1.5.3 RT-qPCR

Todos os ensaios de RT-qPCR foram realizados em termociclador em tempo real modelo 7500 FAST (Applied Biosystems/Life Technologies), utilizando o reagente PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems).

Todas as padronizações realizadas continham 3 µL do reagente PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 1,5 µL de amostra de cDNA e 1,5 µL da mistura do *primer*, perfazendo um volume final de 6 µL. No equipamento de PCR em tempo real foi utilizada a opção *Quantitation – standard curve* e as condições de ciclagem foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95° C por 10 min, 40 ciclos de amplificação e detecção a 95° C por 15 seg e 60° C por 45 seg e 72°C por 15 seg. Todas as reações foram feitas em duplicatas, com controles negativos, em placas ópticas de 96 poços MicroAmp™, seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems).

4.4.1.5.4 Concentração dos *primers*

Para que os experimentos de qPCR, que utilizam o fluoróforo SYBR® Green, ocorressem com alta eficiência, foi necessário realizar uma série de padronizações, e a primeira delas foi a padronização da concentração ótima de *primer* a ser utilizada, que deve ser a mínima suficiente para permitir a amplificação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Para isso, foram realizadas diluições dos iniciadores de modo a obter as concentrações de 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM e 800 nM. Como molde da reação foi utilizado um *pool* de amostras de cDNA para cada par de iniciadores (*forward* e *reverse*). A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente.

4.4.1.5.5 Eficiência de reação

Após verificar a melhor concentração dos iniciadores a ser utilizada no experimento, foi realizada a construção de uma curva padrão para verificação da eficiência de amplificação da reação. Para tanto, foram feitas reações com quantidades conhecidas de amostra em escala logarítmica. Os resultados foram utilizados para construção de uma curva padrão Ct versus quantidade de amostra. A eficiência de amplificação (E) foi obtida a partir da fórmula $E = (10^{-1/\text{ângulo}} - 1) \times 100$, onde ângulo corresponde ao coeficiente de inclinação da reta (RASMUSSEN, 2001). Observando-se tal linearidade, qualquer quantidade de amostra dentro da faixa analisada pode ser utilizada nas reações. Para isso, foram utilizados *pools* de cDNA com 5 diluições

conhecidas. Foram considerados no estudo apenas os iniciadores que apresentaram eficiência entre 90-110% e com apenas uma curva de *melting*.

4.4.1.5.6 Expressão gênica relativa

As configurações do equipamento e condições de amplificação foram idênticas as utilizadas na etapa de padronização. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Os resultados brutos obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção.

Os genes *gyrB* e *dnaK* foram utilizados como controle endógeno do nível de expressão relativa aos demais genes de interesse no estudo. O método $\Delta\Delta Ct$ (cycle threshold - Ct) foi utilizado para cálculo da expressão relativa dos genes, uma vez que as eficiências dos *primers* tinham valores compreendidos no intervalo entre 90% e 110%. Utilizando-se o *software* Statistical versão 18.11.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) calculou-se, através de test t *student*, a significância estatística das diferenças observadas entre o controle e DOC 0,1%. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

4.4.2 Comparação do perfil proteico de *Aeromonas*

Os extratos proteicos foram preparados a partir de culturas das bactérias realizadas na ausência e na presença de 0,1% de DOC.

4.4.2.1 Preparo do extrato proteico celular

As bactérias foram cultivadas em TSA (Becton, Dickinson and Co.), incubadas 37°C por 18 horas. Colônias isoladas foram inoculadas em BHI, que foi incubado a 37°C por 18 horas. Após esse período, uma alíquota desta suspensão foi utilizada para preparo de uma suspensão 1:10, também em BHI, que foi incubada a 37°C até obtenção de uma $DO_{600} = 0,3$. Em seguida, 10 mL dessa suspensão foram transferidas para dois tubos e a um deles adicionou-se volume de DOC suficiente para obtenção de uma suspensão a 0,1%. Ao outro tubo adicionou-se volume igual de água. As suspensões

foram incubadas por uma hora a 37°C. Em seguida as suspensões foram centrifugadas (3600rpm, 5min) e o sedimento foi lavado com água, centrifugado novamente e ressuspenso em 50 µL de tampão 5x (Tris-HCl pH 6,8 60mM, glicerol 25%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 14,4mM, 0,1% de azul de bromofenol) e então aquecido a 95°C (5min). Aliquotas do extrato foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE (poliacrilamida 12%, 25 mA, por aproximadamente 2h, em tampão Tris-HCl glicina pH 8,8, utilizando marcador padrão de peso molecular). Após a corrida, os géis foram corados com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) por 24 h e, em seguida, descorados (solução metanol/ácido acético/água [3:1:6]). Uma alíquota do extrato foi retirada antes da adição do tampão para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. veronii bv sobria pode causar várias infecções em humanos incluindo infecções do trato biliar (CHAO et al., 2013), infecções de ferida (HIRANSUTHIKUL et al., 2005), pneumonia (LI et al., 2008), peritonite (MELHUS, 2002), bacteremia (ROBERTS et al., 2006), fasciíte necrosante (CUI et al., 2007), meningite (OUDERKIRK et al., 2004), septicemia (MENCACCI et al., 2003) e mais comumente gastroenterite (ALBERT et al., 2000; GRÖBNER et al., 2007). Neste trabalho, apresentamos características de um isolado de fezes recuperado de um paciente com gastroenterite.

5.1 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *A. VERONII* BV SOBRIA 312M

5.1.1 Sequenciamento e montagem do genoma

O principal desafio em sequenciar genomas se encontra em realizar a sua montagem. O comprimento das sequências geradas pelos modernos instrumentos de sequenciamento é consideravelmente menor que os genomas. Assim, muitas análises começam com o processo computacional de montagem de sequências que junta os muitos fragmentos (*reads*) de sequência gerados pelo instrumento (NAGARAJAN; POP, 2013).

A metodologia de montagem consiste em unir *reads* para formar *contigs* que por sua vez se unem para formar os *scaffolds* que correspondem a trechos de sequências mais longas, com o objetivo de retratar a estrutura do genoma o mais adequado possível (EKBLON; WOLF, 2014).

5.1.1.1 Sequenciador 454 GS Junior

O sequenciador 454 GS Junior se baseia no pirosequenciamento, um método não-eletroforético, que emprega uma técnica de sequenciamento bioluminescente baseada em sequenciamento por síntese. Baseia-se na detecção em tempo real de pirofosfato inorgânico (PPi) liberado a partir da incorporação de nucleotídeos durante a

síntese de DNA, convertendo-o proporcionalmente em luz visível por meio de uma série de reações enzimáticas. O PPi é convertido à adenosina trifosfato (ATP) pela ATP sulfúrilase, e o ATP gerado é captado pela luciferase que produz fótons. ATPs e dNTPs não utilizados são degradados pela enzima apirase. A presença ou a ausência de PPi, e, portanto, a incorporação ou não de cada nucleotídeo adicionado, é avaliada com base na detecção ou não da emissão de fótons (ELAHI e RONAGHI, 2004). Neste método de pirosequenciamento os sinais quimioluminescentes são registrados pela câmera CCD acoplada ao equipamento, durante todo o processo, em tempo real, para identificar os poços contendo DNA molde e para avaliar as intensidades dos sinais associados à inserção dos nucleotídeos complementares. Os dados brutos consistem de uma coleção de imagens digitais a partir das quais a sequência de nucleotídeos dos fragmentos da biblioteca de DNA é determinada através de um *software*.

O sequenciamento realizado no sequenciador 454 GSJr (Roche®) (realizado no período do mestrado) resultou em 96.886 *reads* com tamanho médio de 438 pb, totalizando 43.503.289 pb. As sequências foram montadas utilizando o *software* GS *de novo* Assembler v.2.7 (Roche). O tamanho estimado do genoma foi de 4.477.885 pb alocados em 526 *contigs* o maior com 116.270 pb e o menor com 101pb, e tamanho médio de 8.497 pb. A cobertura foi de aproximadamente 10 X. O número de bases com qualidade \geq Q40 foi 4.434.589 (97,6%). O conteúdo de C+G foi de 58,7%.

5.1.1.2 Sequenciador Illumina Miseq

O sequenciamento na plataforma Illumina é baseado na síntese da molécula de DNA, utilizando a enzima DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com fluoróforos, da mesma maneira que no sequenciamento pelo método de Sanger (CARVALHO e DA SILVA, 2010). A amplificação dos fragmentos de DNA é realizada em uma superfície sólida, processo chamado de PCR em fase sólida, em que uma alta concentração de *primers forward* e *reverse* estão covalentemente ligados a um suporte, de tal maneira que a proporção de *primers* e fragmentos no suporte irá definir a densidade de *clusters* amplificados. Podem ser produzidos de 100 a 200 milhões de *clusters*, os quais possuem uma extremidade 3' livre para o anelamento do *primer* dando continuidade à reação de sequenciamento (METZKER, 2010). Esta se inicia com a incorporação de um nucleotídeo, detecção da fluorescência e clivagem. Inicialmente a

DNA polimerase se liga ao *primer*, adiciona um único nucleotídeo modificado (dideoxynucleotídeo, extremidade 3'-OH bloqueada) e marcado com fluorescência (uma coloração para cada nucleotídeo, ATCG). A reação de síntese é terminada, os nucleotídeos não incorporados são lavados, é capturada uma imagem da fluorescência emitida por cada nucleotídeo incorporado. Em seguida há uma reação de clivagem da extremidade 3'-OH bloqueada e da fluorescência, uma nova lavagem é realizada, recomeçando o ciclo com a incorporação de um dideoxynucleotídeo pela DNA polimerase (METZKER, 2010). A leitura das bases é feita pela análise das imagens capturadas durante a reação de sequenciamento, e a montagem dos *contigs* é realizada por um *software*. Essa plataforma pode produzir leituras de até 150 pb e possui como principal vantagem a elevada qualidade dos dados gerados e como limitação o tamanho reduzido das leituras (METZKER, 2010; SHOKRALLA et al., 2012).

O sequenciador Illumina Miseq forneceu 9.199.874 leituras resultando em 1.464.278.530 pb. As sequências foram montadas utilizando o *software* CLC Main Workbench 6.5.1 (CLC bio) gerando um genoma de tamanho 5.225.715 pb, alocados em 90 *contigs*, com tamanho médio de 2.186 pb, sendo que o maior *contig* apresentou 587.609 pb, o conteúdo de C+G do genoma foi 58,4%.

5.1.1.3 Montagem com dados dos sequenciadores 454 GS Junior e Illumina

As sequências obtidas nos dois sequenciadores foram utilizadas para uma nova montagem do genoma utilizando diferentes ferramentas de bioinformática (Tabela 4). A montagem do genoma, realizada pelo *software* SPAdes v.3.10, resultou em 186 *contigs* e o tamanho estimado do genoma 4,33 Mb. O Velvet gerou entre 32770 (21-mer) e 70333 (103-mer) *contigs*. Os *contigs* foram submetidos ao GFinisher, o que resultou no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M de 4,57 Mb, conteúdo GC de 58,6% em uma montagem com 14 *contigs* e cobertura de 320x.

Quando comparado aos genomas completos de estirpes de *A. veronii* depositados no NCBI, o genoma de *A. veronii* bv sobria 312M é menor que os de *A. veronii* AVNIH1 (4,95 Mb) e *A. veronii* FC951 (4,86 Mb), as duas estirpes clínicas dessa espécie com genoma completo, e é compatível com o tamanho dos demais (4,28-4,92 Mb). O teor de GC de 58,6% é semelhante a todos os genomas completos de *A. veronii* (58,3-58,8%).

TABELA 4. RESUMO DA MONTAGEM DO GENOMA DE *A. veronii* bv sobria 312M

	454 GS Jr	Illumina	454 GS Jr + Illumina
Tamanho (Mb)	4,47	5,22	4,57
Contigs	526	90	14
C+G%	58,7	58,4	58,6

FONTE: O Autor (2019)

A sequência foi depositada no *GenBank*, sob o número de acesso RHDQ00000000.

5.1.2 Average Nucleotide Identity – ANI

Bactérias do gênero *Aeromonas* não são difíceis de serem isoladas em laboratório, mas podem ser erroneamente identificadas como pertencentes a outros gêneros principalmente *Vibrio* e *Plesiomonas* (BEAZ-HIDALGO et al., 2010; JANDA; ABBOTT, 2010). Além disso, a identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie requer a utilização de vários testes bioquímicos, alguns não disponíveis nos laboratórios de rotina (ABBOTT et al., 2003) e mesmo assim eventualmente se obtém apenas a identificação ao nível de complexo (SUREK et al., 2010).

Devido à dificuldade de se determinar com certeza a identidade das espécies de *Aeromonas*, os dados do genoma foram utilizados para determinar o valor de ANI. Os resultados estão indicados na Tabela 5.

TABELA 5. VALORES DE ANI DETERMINADOS PARA *A. veronii* bv sobria 312M EM RELAÇÃO A OUTRAS ESPÉCIES DE *Aeromonas* COM GENOMA DEPOSITADOS NO NCBI

(continua)		
Espécies de <i>Aeromons</i>	BioProjeto	Valor de ANI (%)
<i>A. aquatica</i> MX16A	PRJNA260478	87,40
<i>A. caviae</i> 8LM	PRJNA277314	86,04
<i>A. caviae</i> FDAARGOS_72	PRJNA231221	86,09
<i>A. caviae</i> NCTC12244	PRJEB6403	85,99
<i>A. caviae</i> R25-2	PRJNA428427	85,98
<i>A. caviae</i> R25-6	PRJNA428427	86,03
<i>A. caviae</i> T25-39	PRJNA428427	86,01
<i>A. dhakensis</i> KN-Mc-6U21	PRJNA400818	86,96
<i>A. hydrophila</i> 4AK4	PRJNA210524	85,92
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	PRJNA16697	87,30
<i>A. hydrophila</i> AH10	PRJNA278509	87,38
<i>A. hydrophila</i> AHIN1	PRJNA273636	87,24
<i>A. hydrophila</i> AL06-06	PRJNA227242	87,37
<i>A. hydrophila</i> AL09-71	PRJNA227037	87,47
<i>A. hydrophila</i> D4	PRJNA308632	87,49
<i>A. hydrophila</i> GYK1	PRJNA323754	87,49
<i>A. hydrophila</i> J1	PRJNA227242	87,47
<i>A. hydrophila</i> JBN2301	PRJNA302121	87,45
<i>A. hydrophila</i> KN-Mc-1R2	PRJNA438415	87,33

(conclusão)		
Espécies de <i>Aeromonas</i>	BioProjeto	Valor de ANI (%)
<i>A. hydrophila</i> ML09-119	PRJNA188141	87,45
<i>A. hydrophila</i> MX16A	PRJNA353572	87,38
<i>A. hydrophila</i> NJ-35	PRJNA226230	87,41
<i>A. hydrophila</i> Pc104A	PRJNA227038	87,43
<i>A. hydrophila</i> WCHAH045096	PRJNA415336	87,48
<i>A. hydrophila</i> WCX23	PRJNA530076	87,46
<i>A. hydrophila</i> YL17	PRJNA234473	87,10
<i>A. hydrophila</i> ZYAH72	PRJNA339368	87,32
<i>A. hydrophila</i> ZYAH75	PRJNA339336	87,34
<i>A. media</i> WS	PRJNA170164	86,01
<i>A. salmonicida</i> 01-B526	PRJNA264317	85,63
<i>A. salmonicida</i> 34mel	PRJNA299262	85,83
<i>A. salmonicida</i> A449	PRJNA16723	85,68
<i>A. salmonicida</i> A527	PRJNA264317	85,79
<i>A. salmonicida</i> O23A	PRJNA383853	85,76
<i>A. salmonicida</i> RFAS1	PRJNA342065	85,78
<i>A. salmonicida</i> S121	PRJNA391818	85,68
<i>A. salmonicida</i> S44	PRJNA391845	85,69
<i>A. salmonicida</i> S68	PRJNA391844	85,67
<i>A. schubertii</i> WL1483	PRJNA297116	82,03
<i>A. veronii</i> 17ISAe	PRJNA438884	95,55
<i>A. veronii</i> AVNIH1	PRJNA279607	95,62
<i>A. veronii</i> B565	PRJNA63671	95,60
<i>A. veronii</i> CB51	PRJNA319612	95,59
<i>A. veronii</i> FC951	PRJNA428153	95,32
<i>A. veronii</i> MS-18-37	PRJNA504296	95,65
<i>A. veronii</i> TH0426	PRJNA293940	95,63
<i>A. veronii</i> X11	PRJNA419084	95,63
<i>A. veronii</i> X12	PRJNA419086	95,52

FONTE: O autor (2019).

NOTA: Foram utilizados na análise genomas completos de *Aeromonas* publicados até janeiro de 2019; em negrito os valores de ANI acima de 95%.

Os dados da Tabela 5 mostram valores de ANI elevados na comparação com outras espécies do mesmo gênero. No entanto, valores $\geq 95\%$ são considerados para definir a identidade de uma espécie através do ANI (GORIS et al., 2007). Valores nesse patamar foram observados apenas com estirpes de *A. veronii* (Tabela 5), confirmando que a bactéria em estudo pertence a essa espécie e apresenta maior identidade com *A. veronii* MS-18-37 (95,65%).

A confirmação da espécie é relevante uma vez que a disponibilidade do genoma poderá ter repercussões importantes, como para o desenvolvimento de novos testes para a identificação da espécie, em estudos sobre a sua virulência e até mesmo na criação de vacinas ou novas formas de combate às infecções causadas pela bactéria.

Além disso, a aplicação do ANI vem sendo defendida como estratégia a ser utilizada para evitar que genomas de *Aeromonas* sejam erroneamente identificados. Estudo recente, utilizando análise filogenética multilocus (MLPA) e ANI, mostrou que

36% dos genomas de *Aeromonas* não-espécie tipo depositados no *GenBank* estavam erroneamente identificados. Na maioria deles, *A. dhakensis* foi erroneamente identificada como *A. hydrophila*, mas também se verificou que as bactérias identificadas como *A. veronii* AMC34 e *A. hydrophila* 4AK4 eram representantes de novas espécies do gênero, e que *A. hydrophila* HZM pertence à espécie *A. caviae* (BEAZ-HIDALGO et al., 2015).

A espécie *A. veronii* contém duas biovariedades, designadas *A. veronii* bv sobria e *A. veronii* bv veronii, está pouco frequente em amostras clínicas humanas (JANDA; ABBOTT, 1998). Estas variedades podem ser distinguidas com base na atividade das enzimas ornitina descarboxilase e arginina dihidrolase (ABBOTT et al. 2003). Os ensaios forneceram resultado negativo para ornitina descarboxilase e positivo para arginina dihidrolase, indicando que a bactéria é *A. veronii* bv sobria (SUREK et al., 2010), uma das causas mais comuns de infecções humanas provocadas *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010).

5.1.3 Anotação do genoma

Depois do alinhamento das *reads*, ainda não se obtêm instantaneamente informações biológicas acerca do organismo. Para aproveitar todo o potencial da sequência do genoma, ele precisa ser anotado, a fim de identificar os elementos que o compõem, trazendo informações biologicamente relevantes e que nos levem a uma compreensão dos processos biológicos (STEIN, 2001; EKBLON; WOLF, 2014).

O processo de anotação pode ser dividido em três níveis: anotação em nível de nucleotídeos, ou seja, buscamos a localização das sequências e genes; anotação em nível de proteínas, que define e atribui função às proteínas presentes; e em nível de processo que busca identificar as vias metabólicas das quais esses genes fazem parte (STEIN, 2001).

Para obtermos essas informações, dispomos de dois principais processos: anotações automáticas, onde as análises são feitas por meio de programas, e as anotações manuais.

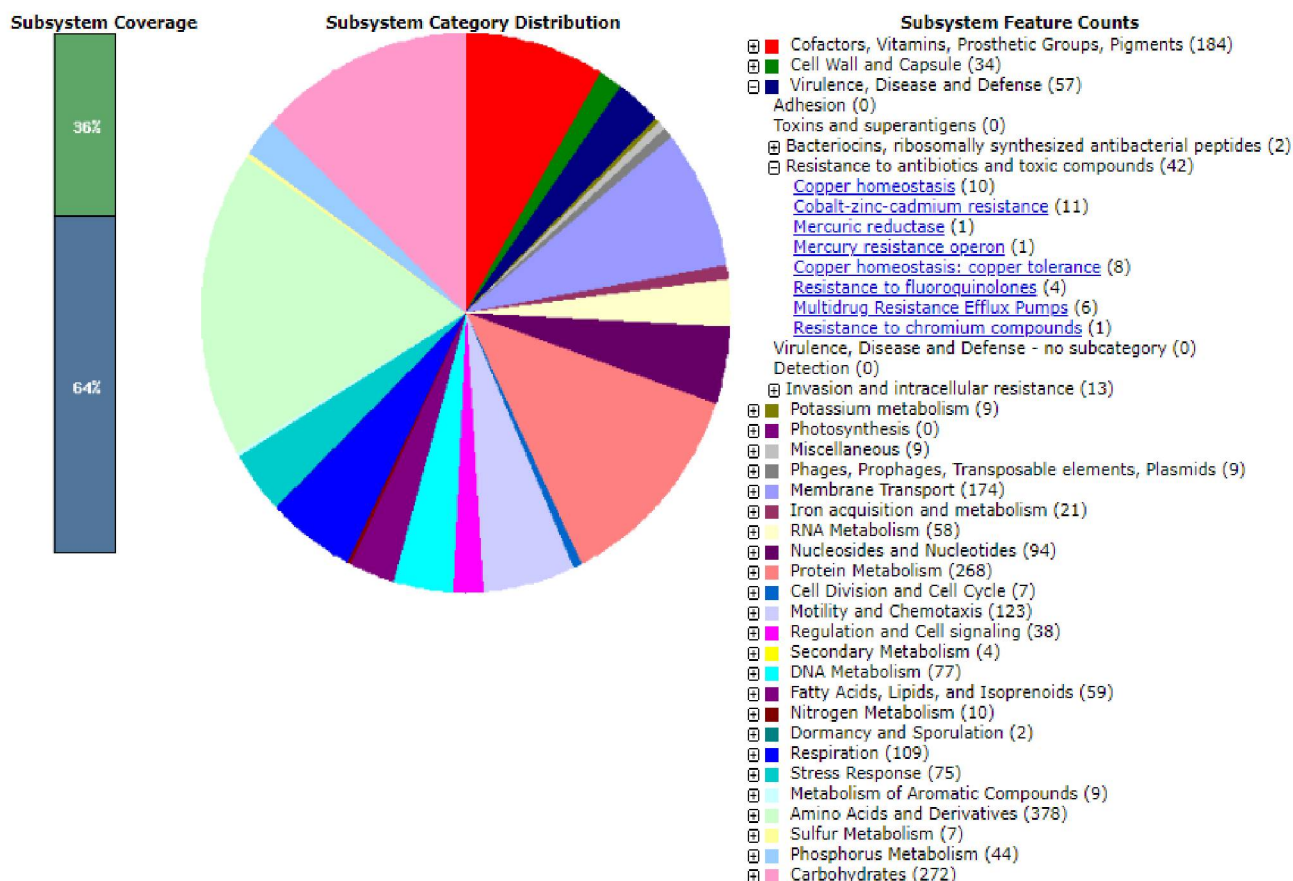
A anotação disponível no NCBI indicou 4.234 genes, incluindo 4.032 proteínas, 70 pseudogenes, 133 RNAs, incluindo 100 tRNAs, 4 ncRNAs e 28rRNA (11, 9 e 9 cópias de 5S RNA, 16S RNA e 23S RNA, respectivamente).

A anotação realizada pelo RAST identificou 130 RNAs e um total de 4.262 sequências codificantes, das quais 36% (1502) foram classificadas em 360 subsistemas (Figura 2). As principais categorias de genes foram associadas ao metabolismo de aminoácidos e derivados (378), carboidratos (272), proteínas (268), cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (184) e transporte de membrana (174). RAST também revelou 42 genes associados a resistência a antibióticos e compostos tóxicos, incluindo genes de resistência a fluoroquinolonas (4), bombas de efluxo de resistência a multidrogas (6), homeostase do cobre (10), resistência a cádmio, cobalto e zinco (11), tolerância ao cobre (8), mercúrio redutase (1), operon de resistência ao mercúrio (1) e resistência a compostos de cromo (1). Além disso, o RAST anotou um cluster de genes que codifica a colicina V, diversos genes envolvidos no transporte de membrana, incluindo os sistemas de secreção tipo II, III, IV e VI, transportadores ABC, proteínas de translocação, e proteínas de resposta ao estresse osmótico, oxidativo e periplasmático.

As anotações realizadas pelo RAST e pelo KEGG mostraram várias vias metabólicas completas associadas com o metabolismo de carbono. Entre elas, glicólise e gliconeogênese, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, utilização de glucose, frutose, galactose, manitol, sacarose, maltose, trealose e N-acetil-D-glucosamina estão presentes. Estes dados estão em conformidade com a habilidade demonstrada por *A. veronii* bv sobria 312M de crescer utilizando vários aminoácidos e carboidratos, isoladamente, como única fonte de carbono (PREDIGER et al., 2017).

Os patógenos extracelulares colonizam microambientes que frequentemente variam quanto ao suprimento de nutrientes e condições fisiológicas, então precisam passar por transições frequentes que requerem adaptações metabólicas adequadas especialmente em relação ao metabolismo de carbono. Este é considerado essencial durante os estágios iniciais de muitas infecções bacterianas, e a habilidade de utilizar uma variedade de substratos de carbono, especialmente as glicoproteínas que estão amplamente disponíveis no hospedeiro, é uma vantagem para as bactérias patogênicas (FABICH et al. 2008; FUCHS et al. 2012). A importância das vias metabólicas requeridas no processo de colonização do hospedeiro levou à introdução dessas vias na nova definição de virulência, juntamente com os fatores de virulência clássicos (MOBLEY 2015).

FIGURA 2. ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *A. veronii* bv sobria 312M EM SUBSISTEMAS PELO ANOTADOR RAST



FONTE: Rapid Annotations using Subsystems Technology

LEGENDA: Subsystem Coverage - verde representa a porcentagem de genes classificados nos subsistemas; azul representa a porcentagem de genes não classificados nesses subsistemas.

O epitélio intestinal é recoberto por uma camada de muco cujos principais componentes são mucinas, proteínas intensamente glicosiladas. Serina e treonina são os aminoácidos prevalentes no *core* proteico da mucina que também contém uma elevada concentração de prolina, ácido aspártico e glutâmico. As cadeias oligossacarídicas da mucina são formadas por fucose, galactose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico (PODOLSKY; ISSELBACHER, 1983; KIM; KHAN 2013), manose e glucose (PODOLSKY; ISSELBACHER, 1983). Estes componentes da mucina, liberados pela ação de bactérias que degradam mucina presentes no intestino, tem um papel importante na colonização bacteriana servindo como fontes de carbono e energia (DERRIEN et al., 2010).

Vias completas para a utilização de três (glucose, galactose e N-acetil-D-glucosamina) desses carboidratos foram identificadas no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M. Ensaios realizados com Biolog GN2 (Biolog), microplacas contendo 95

substratos de carbono distintos, confirmaram a utilização desses carboidratos *in vitro* por *A. veronii* bv sobria 312M, além de ácido glutâmico, serina e manose (PREDIGER et al., 2017), outros componentes encontrados na mucina intestinal. Estes dados sugerem que *A. veronii* bv sobria 312M é capaz de utilizar alguns componentes da mucina intestinal, o que pode contribuir para a colonização do intestino e para causar diarreia.

Estudos realizados com *Escherichia coli* MG1655 (comensal) e *E. coli* EDL933 (*E. coli* enterohemorrágica, um enteropatógeno) no intestino de ratos indicaram que o catabolismo de arabinose, fucose e N-acetilglucosamina é importante para a colonização intestinal de ambas as bactérias. No entanto, essas bactérias divergiram em relação ao uso de outros carboidratos para colonizar o intestino de ratos. *E. coli* MG1655 utilizou gluconato e ácido N-acetilneuramínico ao passo que *E. coli* EDL933 utilizou galactose, manose e ribose, não empregadas pela MG1655 (FABICH et al. 2008). A utilização de carboidratos distintos entre as bactérias comensal e patogênica sugere uma estratégia empregada pelos patógenos entéricos para invadir e colonizar o intestino na presença de comensais (FABICH et al. 2008).

Até o momento não há estudos similares de competição realizados com *Aeromonas*, mas é possível que essas bactérias utilizem a mesma estratégia para causar infecção intestinal. Esta suposição decorre da habilidade de *A. veronii* bv sobria 312M utilizar uma variedade de fontes de carbono *in vitro* incluindo alguns essenciais para a colonização intestinal por *E. coli* EDL933 (PREDIGER et al., 2017).

5.1.4 Genes associados à virulência e resistência

O desenvolvimento de infecção depende da capacidade de uma bactéria aderir às células do hospedeiro, invadir células ou tecidos, escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e produzir doença. Estes processos são mediados pela expressão de genes que são apenas parcialmente conhecidos em *Aeromonas* (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013). A descrição de genomas de espécies de *Aeromonas* permitiu a identificação de diversos genes de virulência que afetam o potencial patogênico dessas bactérias (GRIM et al., 2014), entre eles os que participam da adesão, colonização e infecção no hospedeiro incluindo componentes estruturais, fatores extracelulares, sistemas de secreção, aquisição de ferro e mecanismos de “quorum sensing” (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013; GRIM et al., 2014).

A pesquisa de genes associados à virulência e resistência no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M foi realizada de forma manual através de comparação pelo BLAST de genes já associados com virulência em estirpes de *Aeromonas*. Os fatores de virulência pesquisados e os resultados da análise estão apresentados na tabela 6.

TABELA 6. GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *A. veronii* bv sobria 312M

Função	Identidade (%)	Cobertura (%)
MOTILIDADE E ADESÃO		
Flagelo lateral ^a	76-95	86-98
Flagelo polar	80-100	87-100
Pilus Tap tipo IV	94-100	96-100
Pilus Flp tipo IV	96-100	97-100
Pilus Msh tipo IV ^a	79-99	84-100
Fimbria tipo I	97-100	98-100
TOXINAS/OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA		
Enterotoxina citotônica termolábil (Alt)	81	87
Enterotoxina citotóxica (Act)	99	99
Hemolisina termoestável	95	97
Hemolisina, HlyA	100	100
Hemolisina III	98	98
Hemolisina	78	88
Fosfolipase A1 ^b	76	85
Hialuronidase	85	92
Serina protease	80	99
Enolase	100	100
DNA adenina metilase (Dam)	95	98
Glucose-inhibited division protein (GidA)	96	98
Mucin-desulfating sulfatase	75	84
Colagenase	99	99
SISTEMA DE SECREÇÃO		
T2SS	93-100	95-100
T3SS ^a	89-100	83-100
T6SS ^a	82-98	88-100
QUORUM SENSING		
Autoindutor AhyI	75	86
Proteína ativadora transcricional, AhyR	90	94
Sistema QseBC	81-89	88-94
Ribosil-homocisteína liase, LuxS	97	98
AQUISIÇÃO DE FERRO		
Regulador de absorção de ferro (Fur)	95	97
Captação do grupo heme	79-99	85-99
RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS		
Beta-lactamase CphA	92	97
Beta-lactamase	96	97
Cloranfenicol acetiltransferase	87	92
Aminoglicosídeo fosfotransferase	83	90

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: ^a Algumas dessas regiões genômicas apresentaram identidade e/ou cobertura inferior a 75%. Nestes casos, a presença do gene foi confirmada com outros genomas de referência de *Aeromonas*.

^bAlt/fosfolipase A1 apresentaram alta identidade e cobertura para a mesma sequência do genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, Alt foi considerado devido à maior similaridade.

Adicionalmente, a análise do *software* ResFinder, um software curado, indicou apenas a presença de genes que codificam as β -lactamases AmpS e CphA.

Para causar doença os enteropatógenos precisam escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, competir com a microbiota comensal e se estabelecer no intestino. É um processo complexo que requer vários passos inter-relacionados, desde a produção de bacteriocinas, motilidade, adesão, colonização, formação de biofilme, à elaboração de fatores que causam lesão e/ou alteram a fisiologia das células intestinais (JANDA; ABBOTT, 2010).

Vários genes associados com virulência foram identificados no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M (Tabela 6) e alguns podem ser potencialmente associados com o desenvolvimento de diarreia.

A anotação pelo RAST indicou a presença no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M de genes codificando a bacteriocina colicina V. Colicinas são substâncias com atividade antibiótica produzidas por bactérias e que tem ação letal contra estirpes sensíveis. A produção de colicina V foi inicialmente identificada em *E. coli*, mas posteriormente verificou-se que outras bactérias produziam substâncias com ação similar levando ao uso do termo mais amplo “bacteriocinas” para designar esses compostos (WATERS; CROSA, 1991). Portanto, a produção de colicina V pode ser uma característica importante na competição de *A. veronii* bv sobria 312M com a microbiota normal durante o processo de colonização do intestino.

Componentes estruturais da bactéria também podem contribuir para a virulência, destacando-se flagelos, fimbrias e o lipopolissacarídeo. O último compõe a membrana externa, parte da parede celular de bactérias Gram-negativas. A anotação realizada pelo RAST indicou a presença de 170 genes associados com a biossíntese da parede celular de Gram-negativos incluindo polissacarídeos capsulares ou extracelulares.

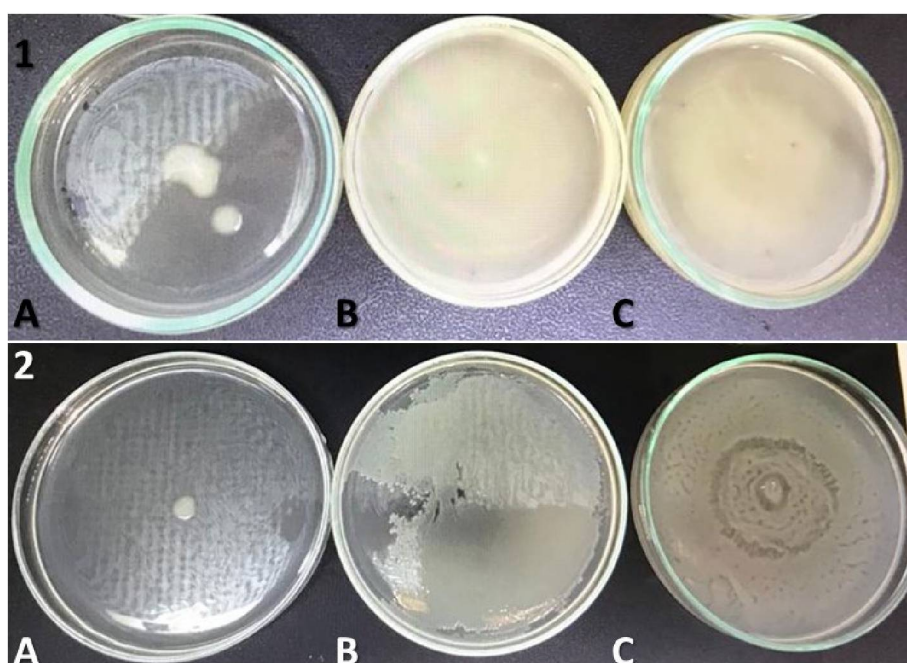
Genes codificando para pili/fimbria e flagelos, estruturas fundamentais para adesão e motilidade bacteriana, também foram identificados no genoma (Tabela 6).

A motilidade via flagelo representa uma vantagem para as bactérias, permitindo o deslocamento para microambientes com condições favoráveis ou evitar condições prejudiciais ao crescimento. Assim, também facilita a competição das bactérias flageladas com outros micro-organismos (JANDA; ABBOTT, 2010).

As *Aeromonas* mesofílicas apresentam um único flagelo polar, expresso constitutivamente em ambientes líquidos ou sólidos. No entanto, cerca de 50 a 60% das

estirpes mais comumente associadas com diarreia são capazes de expressar flagelos laterais, induzíveis, em ambientes viscosos ou em superfícies (KIROV et al., 2002). Ambos os tipos flagelares estão codificados no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M (Tabela 6). A expressão dos flagelos foi inferida através dos resultados positivos obtidos nos ensaios de *swimming*, que indica a presença do flagelo polar e *swarming* que evidencia a expressão de flagelos laterais. Os resultados estão mostrados na Figura 3.

FIGURA 3. ENSAIOS DE MOTILIDADE *SWIMMING* E *SWARMING* DE *A. veronii* bv sobria 312M.



FONTE: O Autor (2019)

LEGENDA: 1. Estirpes inoculadas em meio LB contendo 0,3% de ágar utilizado para determinar a motilidade tipo *swimming*. 1A. *A. hydrophila* ATCC®7966™, observa-se o crescimento da bactéria apenas no ponto de inoculação, controle negativo. 1B. Cultura de *A. veronii* bv sobria 312M apresentando motilidade tipo *swimming*; 1C. Cultura de *Proteus mirabilis* ATCC® 25933™, observa-se a disseminação da bactéria pela placa a partir do ponto de inoculação, o que caracteriza teste de *swimming* positivo.

2. Estirpes em meio LB contendo 0,5% de ágar e 0.005% de tween 80 utilizado para determinar a motilidade tipo *swarming*. Bactérias retiradas da placa de *swimming* foram inoculadas na superfície do ágar. 2A. *A. hydrophila* ATCC®7966™, controle negativo. 2B. Cultura de *A. veronii* bv sobria 312M apresentando motilidade tipo *swarming*. 2C. Cultura de *P. mirabilis* ATCC® 25933™, observa-se o espalhamento da bactéria na superfície do meio, caracterizando teste de *swarming* positivo.

As espécies mesofílicas de *Aeromonas* são móveis (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003) e contém flagelo polar monotríquico associado com a motilidade tipo *swimming* em meios líquidos (KIROV et al., 2002; JANDA; ABBOTT, 2010). Foi demonstrado que o flagelo lateral de *Aeromonas* facilita a adesão e invasão a células epiteliais HEp-2 e a habilidade para formar biofilmes *in vitro* (GAVÍN et al, 2003).

Além da sua função associada à motilidade, os flagelos de *Aeromonas* também desempenham um outro papel importante, atuam como adesinas capazes de mediar a ligação da bactéria às células intestinais humanas. Ensaio realizados com linhagens celulares indicaram que a adesão inicial é mediada pelos flagelos polares e fortalecida pela expressão dos flagelos laterais. Além disso, no mesmo estudo também foi constatado que a produção desses dois tipos de flagelos pode representar uma vantagem para *A. veronii* bv sobria na colonização intestinal, pois *Aeromonas* mutantes para genes associadas com o flagelo polar e lateral apresentaram níveis de adesão 50% menores em relação as selvagens. Portanto, concluíram que esses flagelos desempenham papel crítico na adesão de *Aeromonas* superfícies da célula hospedeira (KIROV et al., 2004).

Além das funções atreladas à motilidade e adesão, os flagelos também participam na formação de biofilme (KIROV et al., 2004). No presente trabalho a capacidade de *A. veronii* bv sobria 312M formar biofilme foi determinada, e mostrou que a bactéria foi capaz de aderir as superfícies (Tabela 11). No ensaio, realizado em tubos de polipropileno, a capacidade da bactéria formar biofilme correspondeu a 40% do observado para *Pseudomonas aeruginosa* considerada como forte formadora de biofilme (controle positivo). No entanto, a capacidade de formar biofilme pode ser influenciada pelo tipo de material que compõe a superfície utilizada no estudo. Como observado em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, que mostrou baixa ou nenhuma formação de biofilme em superfícies de polipropileno e forte formação de biofilme em borosilicato (CARTER et al., 2016). Estudos realizados com *Aeromonas* também mostraram forte influência da superfície utilizada nos ensaios e sugerem a utilização de tubos de vidro de borosilicato, que permitiram a obtenção de resultados mais reprodutíveis e confiáveis (KIROV et al., 2004). Portanto, é possível que a capacidade considerada como baixa a moderada de *A. veronii* bv sobria 312M formar biofilme, tenha sido influenciada pelo tipo de superfície utilizada no ensaio, como foi observado para *E. coli* O157:H7 e outras estirpes de *Aeromonas*.

Evidências obtidas através do desenvolvimento de mutantes para a produção de flagelos polares e laterais indicam que ambos os tipos flagelares facilitam a formação de biofilme por *Aeromonas*. Sugerem também que os flagelos laterais possivelmente contribuem para o desenvolvimento de infecções persistentes causadas por grupos virulentos de *Aeromonas* no trato gastrointestinal (KIROV et al., 2004).

Portanto, os flagelos desempenham múltiplas funções na patogênese de *Aeromonas*, e representam fatores de virulência relevantes para as estirpes associadas com diarreia uma vez que os processos de motilidade, adesão e formação de biofilme são importantes para a colonização do intestino (JANDA; ABBOTT, 2010).

Outros componentes estruturais codificados no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M que podem desempenhar função na adesão são os pili e fimbrias (Tabela 6). Em bactérias Gram-negativas há quatro tipos de pili designados I-IV, o último é o mais relacionado com adesão ao hospedeiro e virulência (BEAZ-HIDALGO e FIGUERAS, 2013). Genes codificadores de pili tipos I e IV foram identificados em *A. veronii* bv sobria 312M (Tabela 5).

Pili tipo I são comumente encontrados entre *Aeromonas*, mas não estão associados com adesão a células intestinais humanas (TOMÁS, 2012). Por outro lado, essas estruturas podem estar associadas com infecções causadas por *Aeromonas* em peixes. Um estudo realizado em *A. salmonicida*, utilizando mutantes para pili tipo I, indicou que essas estruturas são as adesinas primárias utilizadas pela bactéria para aderir às células epiteliais do intestino de salmão, aumentando a colonização do hospedeiro e a eficiência do processo de infecção (DACANAY et al. 2010). Embora a presença desse pili em *A. veronii* bv sobria 312M não contribua para a infecção em humanos, contribui para a versatilidade da bactéria que apresenta habitat aquático e aumenta a faixa de possíveis hospedeiros.

Em relação ao pili tipo IV, ao menos três classes são produzidas por *Aeromonas* e são designados como Tap, Msh (Bfp) e Flp. Genes que codificam pili tipo Tap foram identificados em todas as estirpes de *Aeromonas* estudadas, incluindo bactérias de origem clínica e ambiental (GRIM et al., 2014). Foi mostrado que pili tipo Tap não está associado com a aderência a células intestinais humanas (KIROV et al., 1999, 2000). Em contraste, eles contribuem para a virulência de *A. salmonicida* em salmão atlântico (BOYD et al., 2008).

Genes codificadores de pili Msh (Bfp) foram observados na maioria das estirpes de *Aeromonas* analisadas (GRIM et al., 2014). Foi demonstrado que eles são necessários para a adesão das bactérias às células intestinais humanas e a formação de biofilme (KIROV et al., 1999, 2000; HADI et al., 2012). Portanto, possivelmente desempenham um papel importante na virulência de *A. veronii* bv sobria 312M e na capacidade de causar diarreia.

Por fim, os genes codificadores de pili tipo Flp foram identificados em uma minoria das estirpes de *Aeromonas*, todas de origem ambiental (GRIM et al., 2014). Não há relatos do seu envolvimento em infecções humanas, e eles contribuem minimamente para a virulência de *A. salmonicida* em salmão (BOYD et al., 2008).

Embora pili tipo Tap aparentemente não contribuam para a patogênese da diarreia e a função dos pili tipo Flp seja desconhecida, é possível que eles contribuam para a adesão a outros hospedeiros, tipos celulares ou superfícies. A presença dos genes que codificam estas estruturas em *A. veronii* bv sobria 312M sugere que eles contribuam de alguma forma para a sua capacidade de adaptação e sobrevivência.

Diversos fatores extracelulares contribuem para a virulência de *Aeromonas*, incluindo vários tipos de toxinas e enzimas incluindo enterotoxinas, hemolisinas, lipases e proteases (JANDA; ABBOTT, 2010; BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013).

Uma vez estabelecidas no intestino *Aeromonas* podem aparentemente produzir diarreia através da produção de toxinas, causando enterite, ou pela invasão do epitélio intestinal causando disenteria ou colite. Várias categorias de toxinas podem participar deste processo (JANDA; ABBOTT, 2010).

Genes codificando para várias toxinas foram identificadas no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, entre elas duas enterotoxinas denominadas respectivamente Act e Alt (Tabela 5).

Alt é uma enterotoxina citotônica termo-lábil que não causa degeneração das células do intestino. Por sua vez, Act é uma enterotoxina citotóxica que provoca dano extensivo ao epitélio intestinal. Além da atividade enterotóxica, Act é uma toxina formadora de poros com atividades hemolíticas e citotóxicas, induz acúmulo de fluido em alças intestinais ligadas e estimula respostas pró-inflamatórias (CHOPRA et al., 2009; JANDA; ABBOTT, 2010).

Um estudo que empregando o modelo murino de diarreia a fim de verificar o efeito dessas toxinas, e mutantes das mesmas, indicou que tanto Alt como Act provocam secreção de fluido intestinal, e estão associadas com o desenvolvimento induzido da doença (SHA et al., 2002). É plausível que a presença de Alt possa exacerbar os efeitos de Act, e a severidade da diarreia, alguma interação foi percebida entre estas enterotoxinas quando mutantes foram testados no modelo murino da doença (SHA et al., 2002). A importância de Act não é limitada somente a sua habilidade de provocar diarreia, mas também pelo potencial para causar doenças não-intestinais fatais

(CHOPRA et al., 2009). Act representa um dos mais importantes fatores de virulência de *Aeromonas*.

Genes codificando quatro hemolisinas distintas, além de Act, estão presentes no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M (Tabela 5). As hemolisinas constituem um grupo de enzimas multi-funcionais que desempenham um papel relevante na patogênese de *Aeromonas* (RASMUSSEN-IVEY et al., 2016). Estas toxinas apresentam atividade formadora de poros e causam lise celular, podendo afetar diversos de células. A atividade de β -hemólise de *A. veronii* bv sobria 312M foi demonstrada pelo crescimento da bactéria em placa de ágar sangue (Figura 4), confirmando a expressão de ao menos uma das toxinas com atividade hemolítica.

FIGURA 4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE *A. veronii* bv sobria 312M.



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: Hemólise em ágar sangue de carneiro 5%

Além disso, enzimas degradativas incluindo serina protease, collagenase, hialuronidase (Tabela 5) também estão codificadas no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M e podem contribuir no processo de patogênese provocando lesão tecidual, liberando nutrientes para o crescimento bacteriano e facilitando a invasão e difusão da bactéria no hospedeiro (JANDA; ABBOTT, 2010).

Enolase, uma enzima da via glicolítica, também foi identificada como fator de virulência em *Aeromonas*. No entanto, o seu papel na patogênese foi ligado à sua expressão na superfície celular e na habilidade de ligar plasminogênio levando à produção de plasmina, ou seja, degradando proteínas do plasma. Foi sugerido que a enolase ligada à superfície tenha um papel na disseminação da bactéria a diferentes órgãos (SHA et al., 2009).

Enzimas citotóxicas e citolíticas que destroem células e tecidos liberam nutrientes e, portanto, representam fatores de virulência em vários patógenos extracelulares (FUCHS et al., 2012).

Outra enzima codificada no genoma foi uma *mucin-desulfating sulfatase*, a qual pode facilitar a degradação da mucina (SESHADRI et al., 2006) e contribuir no processo de colonização intestinal.

Seis sistemas de secreção foram descritos em bactérias Gram-negativas e três deles, sistemas de secreção tipo II (T2SS), tipo III (T3SS) e tipo VI (T6SS) foram relacionados com virulência em *Aeromonas* (GRIM et al., 2014). Estes três sistemas de secreção estão codificados no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M (Tabela 5). O T2SS é necessário para a secreção da enterotoxina citotóxica Act (CHOPRA et al., 2009) além de outros fatores de virulência incluindo proteases (RASMUSSEN-IVEY et al., 2016). Os sistemas de secreção tipos III e VI transportam proteínas efetoras diretamente ao citoplasma das células alvo afetando sua fisiologia.

O sistema de secreção tipo III desempenha papel fundamental na virulência de diversos enteropatógenos (COBURN et al., 2007), mediando processos de adesão íntima às células alvo em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e a formação de lesões do tipo *attaching and effacing* nos enterócitos (FRANKEL et al., 2001; GARMENDIA et al., 2004; PHILLIPS et al., 2004); e invasão em *Shigella* e *Salmonella* (MENARD et al., 1996; ZHOU et al., 1999; GRUENHEID et al., 2003). A importância desse sistema de secreção se reflete nas diversas etapas da patogênese nas quais pode participar, dependendo dos efetores, e inclui colonização e consequente disseminação da bactéria, invasão e disseminação sistêmica, citotoxicidade e lesão tecidual e inflamação, imunidade com imunossupressão e evasão das defesas do hospedeiro resultando na disseminação e persistência da bactéria, e na ruptura de *tight junctions* no intestino, o que contribui para o desenvolvimento da diarreia (COBURN et al., 2007).

A presença de T3SS em *Aeromonas* foi descrita pela primeira vez no isolado clínico *A. dhakensis* (*A. hydrophila*) SSU e associado com citotoxicidade em cultivos celulares. O papel desempenhado pelo T3SS foi avaliado através do desenvolvimento de mutantes que apresentaram redução na citotoxicidade e virulência diminuída em modelos animais (SHA et al., 2005), indicando sua participação na virulência bacteriana.

O T6SS pode transferir diversas proteínas efetoras para células eucarióticas, procarióticas, ou ao meio extracelular, empregando-as na interação com o hospedeiro e contra bactérias competidoras e ambiente. Portanto, dependendo dos efetores associados, pode atuar no processo de patogênese, na competição com outros microrganismos e na adaptação ao ambiente (CIANFANELI et al., 2016). O T6SS pode ser encontrado em diversas bactérias patogênicas, incluindo enteropatógenos como *Campylobacter jejuni* (LERTPIRIYAPONG et al., 2012), *Vibrio cholerae* (MA et al., 2009), *Salmonella* (SANA et al., 2016) entre outros. Estes estudos mostraram que o T6SS pode contribuir para a patogênese, promovendo adesão e colonização como observado em culturas de células epiteliais intestinais, formação de biofilme, promoção da atividade citotóxica em macrófagos, desencadeamento de resposta inflamatória, diarreia e *cross-linking* de actina em células de intestino de camundongo, e na competição com a microbiota normal do intestino em camundongos.

A primeira descrição de T6SS em *Aeromonas* também foi realizada em *A. dhakensis* (*A. hydrophila*) SSU (SUAREZ et al., 2008). Foi mostrado que Hcp, uma proteína estrutural do T6SS e também um efector, era capaz de se ligar a macrófagos de murinos, além de ser translocada para as células hospedeiras, causando apoptose em células HeLa. O desenvolvimento de mutantes para genes estruturais do T6SS resultou em redução na toxicidade para macrófagos murinos e células HeLa. Os mutantes foram mais eficientemente fagocitados pelos macrófagos; e menos virulentos no modelo septicêmico em camundongos (SUAREZ et al., 2008). Posteriormente foi indicado um papel de Hcp na evasão da resposta imune possivelmente inibindo o recrutamento da resposta imune celular, o que facilitaria a multiplicação e disseminação da bactéria (SUAREZ et al., 2010).

Outras funções associadas ao T6SS e relacionadas aos parálogos de Hcp e VgrG, outro componente estrutural e com atividade efectora, estão relacionadas com motilidade bacteriana, produção de protease e formação de biofilme (SHA et al., 2013). Além disso, foi mostrado que o parálogo VgrG1 apresenta atividade de ADP-ribosiltransferase que rompe o citoesqueleto de actina de células alvo, levando à redução da viabilidade celular e aumento da apoptose. Foi sugerido que esta atividade possa desencadear despolimerização da actina com efeitos fatais na barreira epitelial do intestino, permitindo a entrada de outros fatores de virulência associados com a patogênese da diarreia (SUAREZ et al., 2010b).

Estudo que comparou o potencial de virulência em *Aeromonas* utilizando os modelos de infecção murinos septicêmico ou intramuscular, revelou a presença da toxina Act e dos sistemas de secreção tipos III e VI nas estirpes mais virulentas (GRIM et al., 2014). Portanto, a presença de genes codificando todos esses fatores de virulência, em *A. veronii* bv sobria 312M, sugere que esta estirpe apresenta elevado potencial de virulência.

Outro fator fundamental para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro é a disponibilidade de ferro. Este é um nutriente essencial e muitas bactérias patogênicas dependem de mecanismos de aquisição de ferro, para a sua sobrevivência no hospedeiro, que contribuem para a sua virulência. No genoma de *A. veronii* bv sobria 312M foram identificados genes codificando o regulador transcricional Fur e proteínas para a captação do grupo heme.

Também foram identificados no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M outros genes associados com virulência que codificam Dam e GidA que controlam a expressão de Act (EROVA et al., 2012), e o sistema “quorum sensing”, que regula a expressão do T6SS, Act, motilidade *swimming* e *swarming*, protease e formação de biofilme (KHAJANCHI et al. 2009, 2012).

Por fim, foram identificados também genes relacionados com resistência a antibióticos em *A. veronii* bv sobria 312M (Tabela 5). Foram identificados genes codificando duas β -lactamases, cloranfenicol acetiltransferase e aminoglicosídeo fosfotransferase. No entanto, a análise realizada para detectar genes de resistência utilizando o software ResFinder indicou apenas a presença de genes codificando as β -lactamases AmpS e CphA.

Os resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos (Tabela 11) mostram que *A. veronii* bv sobria 312M apresenta resistência apenas a ampicilina, ampicilina/sulbactam e amoxicilina/ácido clavulânico. A bactéria é sensível à cefalotina, consistente com o que foi descrito para esta espécie (ABBOTT et al., 2003), e aos demais antibióticos testados. Estes resultados são consistentes com a produção de β -lactamases, mas não indicam atividade de cloranfenicol acetiltransferase e aminoglicosídeo fosfotransferase.

AmpS é uma oxacilinase pertencente à classe D das β -lactamases e apresenta perfil de penicilinase, consistente com os resultados do antibiograma. Por sua vez, CphA é uma β -lactamase da classe B, uma carbapenemase de espectro estreito que

geralmente não é detectada no teste de disco difusão utilizando o inóculo padrão (FOSSE et al., 2010; WU et al., 2012), como observado para *A. veronii* bv sobria 312M.

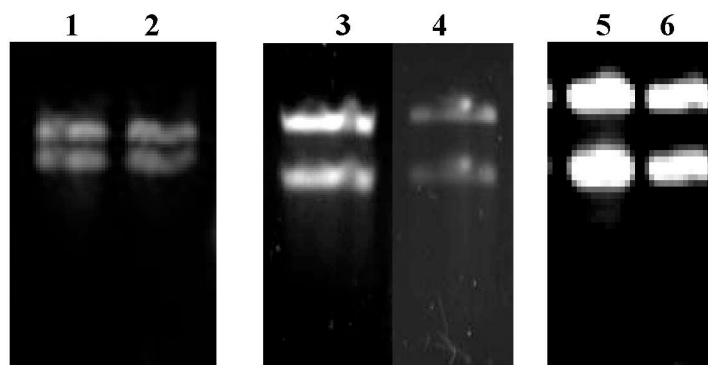
5.2 TRANSCRIPTOMA

O sequenciamento do genoma permite conhecer a sequência de nucleotídeos do(s) cromossomo(s) de um organismo. No entanto, para determinar que proteínas são expressas numa determinada condição utiliza-se as metodologias de transcriptoma. O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula e um resumo das expressões de genes (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Nos últimos anos, a melhoria das técnicas aliada a diminuição de custos dos sequenciamentos de nova geração fez com que o sequenciamento do RNA (RNA-seq) se tornasse uma escolha para estudos de expressão gênica. Estes métodos têm revolucionado os estudos sobre o transcriptoma, permitindo uma ampla gama de novas aplicações, como a construção de transcriptomas de referências ou estudos de expressões específicas (DILLIES et al., 2013).

5.2.1 Qualidade do RNA total

Diversas extrações de RNA total de *A. veronii* bv sobria 312M foram realizadas. A figura 5 apresenta os géis com amostras de RNA extraídas, em que se observam que todas apresentaram duas bandas bem definidas. Essas amostras foram consideradas de boa qualidade para síntese de cDNA e posterior sequenciamento.

Os RNAs que tiveram atestada a integridade por eletroforese foram analisados através do Bioanalyser (Agilent Technologies®), uma abordagem mais sensível, para avaliar além da integridade, a qualidade e quantidade de RNA extraído. Após a confirmação da qualidade das amostras, as triplicatas foram submetidas à síntese de cDNA e posterior sequenciamento.

FIGURA 5. RNA TOTAL DA ESTIRPE *A. veronii* bv sobria 312M.

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo

1. *A. veronii* bv sobria 312M controle; 2. *A. veronii* bv sobria 312M na presença de DOC 0,1%; 3. *A. veronii* bv sobria 312M controle; 4. *A. veronii* bv sobria 312M na presença de DOC 0,1%; 5. *A. veronii* bv sobria 312M controle; 6. *A. veronii* bv sobria 312M na presença de DOC 0,1%

5.2.2 Sequenciamento do mRNA (RNA-seq)

O sequenciamento do cDNA foi realizado no sequenciador Ion Proton. A metodologia utilizada neste equipamento também é baseada no sequenciamento por síntese, mas utilizando uma tecnologia distinta baseada em semicondutores (VAN DIJK et al., 2014). Ao contrário das metodologias existentes, este tipo de sequenciamento não utiliza nucleotídeos marcados com fluorescência, nem sistemas óticos de detecção, e é comumente referido como um pHmetro que sequênciava DNA (RUSK, 2011). O princípio desta metodologia consiste em capturar a molécula de DNA a ser sequenciada, devidamente fragmentada, ligada aos adaptadores de sequenciamento e amplificada por PCR em emulsão. Os fragmentos de DNA são distribuídos em um chip com um sistema micro fluídico, contendo micropoços. Sensores presentes sob cada poço são capazes de detectar a mudança no pH gerada a partir da liberação de íons hidrogênio devido a incorporação dos nucleotídeos (ROTHBERG et al., 2011).

Foram obtidas 23.009.413 leituras para as bibliotecas controle e 13.619.824 leituras para as bibliotecas DOC 0,1%; após o corte de qualidade para um mínimo de 40 pb, 90% de alinhamento e 80% de identidade para referência, cerca de 21.983.826 (95,5%) e 13.163.434 (96,6%) leituras permaneceram, respectivamente. Os resultados mostram que o número de leituras obtidas na biblioteca controle é superior ao obtido na biblioteca preparada com RNA extraído da bactéria em presença de DOC 0,1%.

5.2.3 Análise da expressão diferencial

A análise de expressão diferencial foi realizada através do *software* Deseq, e os transcritos foram considerados como diferencialmente expressos se os valores de \log_2 *fold change* foram ≥ 2 ou ≤ -2 e com significância estatística (p-valor) menor que 0,05. Os resultados estão descritos na tabela 7.

TABELA 7. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DOC 0,1%

ID Genes	Gene	Descrição	Fold Change	log2 Fold Change	P
CDS3141	PhoP	Proteína reguladora transcricional PhoP	10,81	3,43	0,000107
CDS1756		Dehalogenase haloácida	7,06	2,82	0,000504
CDS2844	aaABC	<i>Amino acid ABC transporter substrate-binding protein</i>	11,46	3,52	0,001576
CDS3302	L-PSP	Endoribonuclease L-PSP	50,25	5,65	0,001579
CDS867	-	Proteína hipotética	7,04	2,81	0,002064
CDS2523	SmrB	Endonuclease SmrB	8,53	3,09	0,002377
CDS301	-	Proteína hipotética	-10,8	-3,44	0,002614
CDS3355	DUF2789	DUF 2789	18,49	4,21	0,002763
CDS1267	-	Proteína Putativa ACR	6,29	2,65	0,003245
CDS3142	-	Proteína sensora PhoQ	6,54	2,71	0,004383
CDS1233	-	Proteína transportadora	7,16	2,84	0,005897
CDS3403	-	Corimato mutase-prefenato desidratase	4,62	2,21	0,008588
CDS287	-	Proteína do capsídeo	-4,49	-2,17	0,010553
CDS2387	PotB	Transportador ABC (Espermidina/Putrescina, PotB)	4,29	2,10	0,012799
CDS621		ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	-9,34668	-3,22	0,01354
CDS1960	Serine	Serina protease	-4,27	-2,09	0,015587
CDS578	NupC	Transportador de nucleotídeos dependente de Na ⁺ , NupC	-4,12	-2,04	0,017146
CDS1172	-	Zinco-protease ATP dependente	-4,47	-2,16	0,018201
CDS21	TetR	Regulador transcricional, família TetR	4,56	2,18	0,019165
CDS299	-	Proteína C	-7,35931	-2,88	0,019676
CDS3401	Autotr	Autotransportador	4,29	2,10	0,022264
CDS386	FliQ	Biossíntese Flagelar FliQ	-4,23	-2,08	0,023788
CDS3279	-	Diguanilato ciclase (GGDEF) com sensor PAS/PAC	4,06	2,02	0,027016
CDS3119	-	Proteína hipotética	5,45	2,45	0,02944
CDS1397	-	Proteína hipotética	8,88	3,15	0,033152
CDS19	RNDacr	Sistema de efluxo RND; proteína de resistência à acriflavina	3,09	2,62	0,039542
CDS883	-	Proteína hipotética	4,48	2,16	0,040004
CDS2859	DnaA	Proteína iniciadora de replicação DnaA	4,55	2,18	0,040026
CDS1875	-	Proteína hipotética HutR	6,44	2,68	0,045088
CDS788	-	Arginina/ornitina <i>antiporter</i> ArcD	-4,27	-2,09	0,045148
CDS884	Hemolisina	Hemolisina	-4,08	-2,03	0,046897

FONTE: O Autor (2019)

Após a exposição por 1 hora, um choque, com DOC 0,1% apenas 31 transcritos apresentaram diferenças estatisticamente significativas na expressão em relação ao controle. Destes, 21 apresentaram expressão aumentada e 10 tiveram a expressão reduzida (Tabela 7). Entre os transcritos com expressão aumentada estão representadas os que codificam proteínas hipotéticas (6), associadas com transporte (3), enzimas (3), nucleases (2), reguladores transcricionais (2), proteína com domínio de função desconhecida (DUF), proteína sensora, autotransportador, proteína associada com sistema de efluxo e com duplicação de DNA, um representante de cada.

Os transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette, ABC) são proteínas integrais de membrana que utilizam a energia da hidrólise de ATP para translocar solutos através da membrana celular, representam uma das maiores famílias de proteínas. Através do transporte de íons, açúcares, aminoácidos, vitaminas, peptídeos, polissacarídeos, hormônios, lipídeos, os transportadores ABC estão envolvidos em diversos processos celulares como manutenção da homeostase osmótica, captação de nutrientes, divisão celular, patogênese, xenotoxinas, entre outros (JONES e GEORGE, 2004). Um dos transcritos codifica uma proteína ligadora de substrato de um transportador ABC, outra é proteína potB de transportador ABC de espermidina/putrescina. Putrescina e espermidina são as poliaminas mais comuns em bactérias e desempenham funções importantes na homeostasia celular. Os transportadores Pot consistem em quatro proteínas PotA, uma ATPase; PotB e PotC formam o canal na membrana e PotD é uma proteína periplasmática ligadora de substrato que apresenta um domínio de reconhecimento de poliamina. Este transportador é considerado preferencial para espermidina, mas também transporta putrescina. Entre as funções exercidas pelas poliaminas estão a participação na condensação do DNA, na resposta celular ao estresse oxidativo, interação com radicais livres exercendo um efeito protetor contra espécies reativas de oxigênio (WORTHAM et al., 2007). Portanto, estes resultados indicam que em resposta ao DOC a bactéria intensificou o transporte de aminoácidos, e poliaminas. Pode-se especular que a função das poliaminas nesta situação represente um efeito protetor contra o estresse oxidativo.

Dois outros transcritos com expressão aumentada em presença de DOC, são a endoribonuclease L-PSP e a enzima corismato mutase/prefenato desidratase. A primeira pode inibir síntese de proteína pela clivagem de mRNA. No entanto, ambas as proteínas

apresentam domínios comuns à corismato mutase e da família YjgF ou RidA de proteínas e suas funções variam nas diferentes espécies. A corismato mutase participa da biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina e RidA (L-PSP) desamina enamine/imine reativas intermediárias das reações dependentes de piridoxal 5' fosfato (reações enzimáticas dependentes de PLP) (http://pfam.xfam.org/family/Ribonuc_L-PSP).

A enzima dehalogenase haloácida também teve os transcritos aumentados. Ela pertence à família dehalogenase haloácida, hidrolases que representam uma das maiores famílias de enzimas encontradas em todos os organismos. Nesta família predominam fosfatases (79%) e ATPases (20%), que podem realizar diferentes funções celulares no metabolismo, regulação da atividade de enzimas, atividades de *housekeeping* e captação de nutrientes (KUZNETSOVA et al., 2015).

Os procariotos utilizam sistemas de transdução de sinal para detectar alterações no ambiente e responder à essas alterações. Esses sistemas são divididos em duas categorias, os sistemas de um componente e os de dois componentes. No primeiro caso, as funções sensoriais e de resposta são realizadas pela mesma proteína, ao passo que no segundo essas funções são desempenhadas por proteínas distintas (CUTHBERTSON; NODWELLA, 2013).

Dois reguladores transcricionais tiveram sua expressão aumentada em presença de DOC (Tabela 7). Um deles é um regulador da família TetR, esta é uma grande e importante família de reguladores. Seus componentes são mais conhecidos pelas funções como reguladores de bombas de efluxo de antibióticos. No entanto, podem regular vários aspectos da fisiologia bacteriana. Em *E. coli*, um representante dessa família regula a bomba de efluxo multidrogas AcrAB e a bomba de efluxo de tetraciclina (CUTHBERTSON; AHN; NODWELLA, 2013). É possível que o aumento de expressão desse regulador esteja associado à elevação dos transcritos da proteína de resistência à acriflavina do sistema de efluxo RND (Tabela 7).

As bombas de efluxo da família Resistência-Nodulação-Divisão (RND) como AcrAB de *E. coli*, tem um papel importante na resistência a múltiplas drogas e catalisam o efluxo ativo de muitos antibióticos e agentes quimioterapêuticos. Estas bombas formam complexos tripartites com canais de proteínas de membrana externa e proteínas peiplasmáticas, como AcrAB-TolC de *E. coli*, sugerindo que as drogas são exportadas diretamente para o meio externo. Estudos genéticos e bioquímicos indicaram que esta

bomba é um antiporter droga/proton e que apresenta elevada afinidade por sais conjugados de bile (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

Os sistemas de dois componentes são amplamente utilizados pelas bactérias para sentir e responder às alterações ambientais. Estes sistemas consistem de uma proteína quinase sensora embebida na membrana e o regulador da resposta, citoplasmático. Quando a proteína sensora é ativada por um estímulo ambiental ela se autofosforila e então transfere o grupo fosfato para o regulador de resposta cognato. O regulador ativado subsequentemente se liga a promotores de genes específicos para regular sua expressão, iniciando as respostas celulares às alterações ambientais (HOCH, 2000).

O sistema regulatório de dois componentes PhoPQ, consiste da proteína sensora PhoQ localizada na membrana interna e do regulador PhoP, citoplasmático. Este sistema media a adaptação bacteriana em ambientes limitantes em magnésio, regula a virulência em várias espécies de Gram-negativos e controla modificações de componentes da parede celular. No entanto, muitos dos genes regulados são espécie específicos e conferem características únicas ao micro-organismo (GROISMAN, 2001).

PhoPQ desempenha um papel fundamental na resposta das enterobactérias nos seus hospedeiros mamíferos. Seja residindo ou invadindo, as enterobactérias tem que responder as condições de estresse relacionadas ao hospedeiro que servem como indícios de que a bactéria se encontra no interior do hospedeiro. PhoPQ percebe vários estímulos potencialmente associados com o hospedeiro inclusive limitação extracelular de magnésio, baixo pH, a presença de peptídeos antimicrobianos catiônicos e a ascensão osmótica (YUAN et al., 2017). Portanto, os resultados indicam que estes sistemas regulatórios participam da resposta à bile em *A. veronii* bv sobria 312M.

Os transcritos com expressão reduzida incluem proteínas associadas com transporte (3), potencialmente associadas com virulência (5), proteína C e proteína hipotética (1) (Tabela 7).

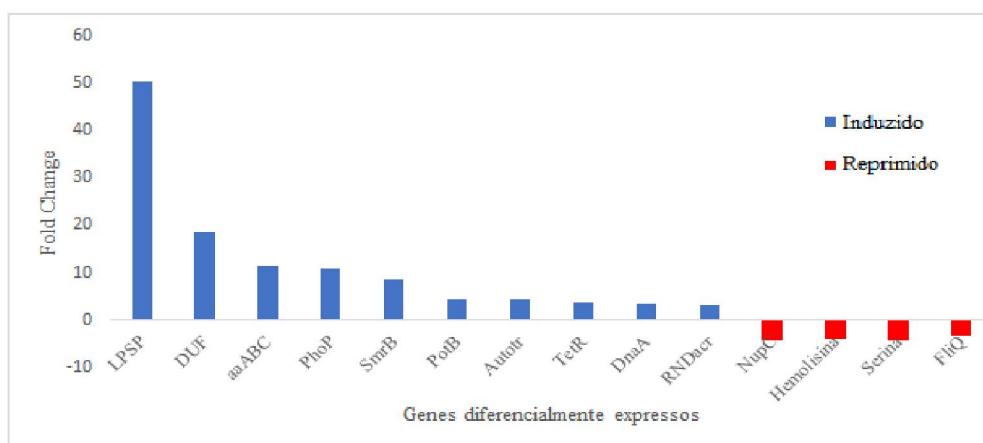
As proteínas associadas com transporte que tiveram sua expressão reduzida frente ao DOC, incluem um componente periplasmático de um transportador do tipo ABC, um transportador de nucleosídeos e a proteína ArcD. Estudos realizados em *Streptococcus gordonii* e mutantes para determinar o papel fisiológico de ArcD, uma proteína transmembrana que media a captação de arginina concomitantemente com a exportação de ornitina de maneira ATP-independente, mostraram para que esta proteína é crucial na captação de arginina e na excreção da ornitina contribuindo para a

manutenção da homeostasia do metabolismo de arginina além de facilitar a interação com outras bactérias e a formação de biofilmes entre duas espécies (SAKANAKA et al., 2015). Se ArC desempenha papel em resposta à bile não é conhecido.

Interessante é que a maioria das proteínas cujos transcritos foram reprimidos pelo DOC inclui aquelas com potencial participação na virulência, hemolisina, proteases, e uma proteína envolvida com exportação e montagem de proteínas do flagelo (CANALS et al., 2006).

Para validar os resultados do transcriptoma, o nível de expressão de 14 genes foi determinado por qPCR. Os genes foram selecionados com base em seus diferentes perfis de expressão gênica e categoria funcional. Os genes escolhidos para validação da expressão gênica e seus respectivos níveis de expressão em *A. veronii* bv sobria na presença de DOC 0,1% estão descritos no gráfico 1.

GRÁFICO 1. NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES EM *A. veronii* bv sobria NA PRESENÇA DE DOC 0,1%.



FONTE: O Autor (2019)

Após escolha dos genes para validação da expressão gênica através de experimentos de PCR em tempo real, foram desenhados iniciadores específicos para cada sequência pelo programa Primer-BLAST, que estão descritos na tabela 8.

Antes da quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real, os experimentos para cálculo da curva de eficiência dos *primers* e da reação foram realizados e os resultados estão descritos na tabela 9.

TABELA 8. INICIADORES UTILIZADOS PARA VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM EXPERIMENTOS DE PCR EM TEMPO REAL.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência F (5' – 3')	Sequência R (5' – 3')
gyrB (controle endógeno)	GGGTCTACTGCTTCACCAA	ACCTTGACGGAGATAACGGC
DNAK (controle endógeno)	GTTCTCCACTGCCGAAGACA	CCCAGAGACTTGTGTCGCT
L-PSP	ACAATCTGGTGATCCGTGCC	CTGTTGGGCAGAGAGATGGT
aaABC	ATCGCCTCTCCCTGCTCTAT	CCTGCTCCTTGCTGAGTACC
PhoP	CATCATCGACCTCGGTCTGC	GGTCAGCACAATGATGGGGA
TetR	TTTACCGATACGGGCACTCC	TTCGGTCAGCGTGATGTTGT
RNDacr	GTATCGTCATCGTGGCAGGT	TTTGTGCTCGGAAGCCAGAT
SmrB	CAGCGATGAGTATCAGCCCC	CGGATAAATCCCCGCTTGA
DUF2789	ACGACCATCACCTCGACAAT	CGGAGTCGTTCCACAGAGC
PotB	TGAGCCTACTAATCTGCGG	GGAAGACAAACAGCGTCAGC
DnaA	CTCGACTGGGGTGTGAGTTT	TCGATGGGCAATTTGAAGCC
NupC	AACCGCCACAACCTGGAAACA	CCCCTCCGAGTTCAGCAT
FleQ	TCCCAATCTTATCGCCGTG	GCCTGACTCACCACCAATCA
Autotr	CGGCAGCACTGAATACACCT	GTAGAGGTTTCAGACCCGTGC
Hemolysin	AATAACCTGGGTGCTGTGCT	GAGTCTGGGGCTGACCAATC
Serine	CCAGCTTGATCGCCTGTTTG	CGCCGCTATCTTGTGAAGC

FONTE: O Autor (2019)

Através das análises de curvas de dissociação para todos os pares de *primers* avaliados (genes alvo + referência) nas condições padrão de RT-qPCR, as concentrações mais adequadas variaram de 100 a 800nM (Tabela 9). As reações de amplificação conduzidas em duplicata foram interpretadas através de suas curvas de dissociação. Para os diferentes genes estudados, as eficiências das reações variaram de 0,95 a 1,12.

TABELA 9. CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE PCR EM TEMPO REAL E EFICIÊNCIA DAS REAÇÕES.

Iniciador	Concentração (nM)	Ângulo	Eficiência
GyrB	800	-3,13	1,04
DnaK	100	-2,80	1,12
L-PSP	400	-3,03	1,06
aaABC	800	-3,04	1,06
PhoP	400	-2,22	1,11
TetR	400	-3,40	0,98
RNDacr	400	-3,02	1,06
SmrB	400	-3,56	0,95
DUF2789	400	-3,06	1,06
PotB	400	-3,00	1,07
DnaA	400	-3,49	0,96
NupC	400	-3,23	1,01
FleQ	800	-3,02	1,07
Autotr	400	-3,02	1,06
Hemolysin	400	-3,54	0,96
Serine	400	-3,35	0,99

FONTE: O Autor (2019)

Os resultados da quantificação da expressão relativa dos genes selecionados para verificar o efeito do DOC em *A. veronii* bv sobria 312M estão descritos na tabela 10.

Os resultados indicam que 9 genes cuja expressão foi analisada por qPCR apresentaram diferença de expressão estatisticamente significativa. A análise revelou que o nível de expressão relativa desses genes seguiu a mesma tendência revelada pela expressão relativa obtida pela análise do transcriptoma, três genes (NupC, FliQ e Hemolisina) apresentaram resultados significativamente maiores nos controles, ou seja, sofreram repressão em presença de DOC. Os genes aaABC, L-PSP, PhoP, PotB, SmrB, e tetR, apresentaram super-expressão na presença de DOC 0,1%. Para três transcritos Autotr (autotransportador), DUF e RNDacr os resultados do teste estatístico ficaram no limite da significância, e a tendência foi a mesma observada no RNAseq (Tabela 7). Para DnaA e serina protease os resultados não foram significativos.

TABELA 10. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM *A. veronii* bv sobria 312M NA PRESENÇA DE DOC 0,1% DETERMINADOS POR PCR EM TEMPO REAL

-Genes	log2 Fold Change	p (teste t)
FliQ	-6,33	0,004629
Hemolisina	-3,75	0,006305
PhoP	4,90	0,008964
L-PSP	4,18	0,014375
aaABC	2,59	0,016822
PotB	2,34	0,028442
SmrB	1,75	0,030342
NupC	-2,93	0,031872
tetR	1,11	0,041954
Autotr	1,20	0,055282
DUF	0,94	0,055851
RNDacr	1,06	0,067976
DnaA	-2,11	0,199321
Serina	-0,79	0,272534

FONTE: O Autor (2019).

5.3 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os resultados do ensaio de formação de biofilme em tubos de polipropileno realizado com a estirpe *A. veronii* bv sobria 312M na presença e ausência DOC 0,1% estão descritos na tabela 11.

TABELA 11. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DOC 0,1%.

Amostra	Média Absorbância ± Desvio Padrão
Meio LB (controle negativo)	0,24 ± 0,09
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	1,3 ± 0,63
<i>A. veronii</i> bv sobria 312M (Controle)	0,48 ± 0,22
<i>A. veronii</i> bv sobria 312M (DOC 0,1%)	0,32 ± 0,14

FONTE: O Autor (2019).

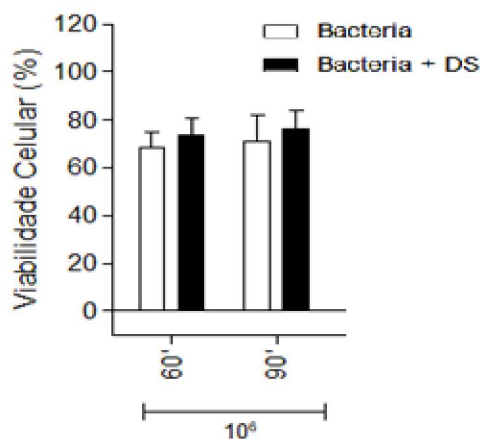
Os resultados demonstram que *A. veronii* bv sobria 312M sobreviveu às atividades antimicrobianas do DOC na concentração de 0,1% e foi capaz de formar biofilme. Porém não houve diferença significativa na capacidade da estirpe formar biofilme em superfície inerte nas duas condições analisadas.

5.4 VIABILIDADE E ADESÃO CELULAR

O possível efeito do DOC 0,1% na adesão de *A. veronii* bv sobria 312M também foi analisado através de cultivo de células HeLa.

A viabilidade de células HeLa na presença de *A. veronii* bv sobria 312M com ou sem adição de DOC foi determinada após 2h e 24h de contato com a bactéria, através de ensaio com o corante cristal violeta. Os resultados obtidos após 24 h de contato entre bactéria e células HeLa estão indicados no gráfico 2.

GRÁFICO 2. VIABILIDADE DE CÉLULAS HELA INFECTADAS COM *A. veronii* bv sobria 312M NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DOC 0,1% APÓS 60 E 90 MINUTOS DE CONTATO.



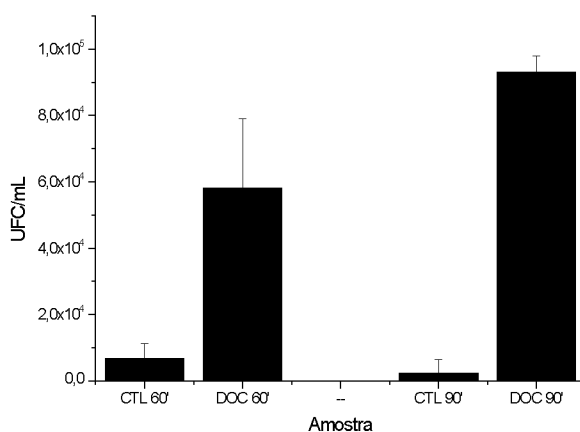
FONTE: O Autor (2019).

NOTA: Bactéria – *A. veronii* bv sobria 312M (Controle); DS – *A. veronii* bv sobria 312M incubada por 60 ou 90 minutos em presença de desoxicolato de sódio 0,1%.

Não houve diferença significativa na viabilidade das células HeLa infectadas com 10^6 bactérias na presença e ausência de DOC 0,1%. No entanto, quando o teste de viabilidade de HeLa foi realizado após contato com 10^7 bactérias as células não estavam mais viáveis, independentemente do DOC. Por essa razão apenas os resultados dos ensaios de adesão realizados com 10^6 bactérias foram considerados.

O efeito do DOC 0,1% na adesão de *A. veronii* bv sobria 312M às células HeLa está representado no gráfico 3.

GRÁFICO 3. ADESÃO DE *A. veronii* bv sobria 312M NA AUSÊNCIA E APÓS CHOQUE COM DOC 0,1% POR 60 OU 90 MINUTOS EM CÉLULAS HELA.



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: $2,0 \times 10^4$ células da linhagem HeLa foram infectadas com suspensão na concentração de 1×10^6 UFC/mL de *A. veronii* bv sobria 312M. O número de bactérias aderidas após 2 h de contato foi determinada através de contagem em placa. CTL- controle; DOC – DOC 0,1%

Os resultados apresentados no gráfico 3 indicam que o choque com DOC 0,1% por 60 ou 90 minutos promoveu aumento da adesão da bactéria às células HeLa.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Jesus e colaboradores (2005), que verificaram que após estresse com desoxicolato, *E. coli* EPEC apresentou aumento da adesão a células epiteliais humanas. Também verificaram que após o estresse houve uma diminuição na expressão de flagelo, demonstrando que os flagelos, neste caso, não estavam desempenhando um papel na adesão.

Os resultados observados no transcriptoma de *A. veronii* bv sobria 312M indicam uma expressão diminuída de FliQ, associado a biossíntese flagelar, sugerindo que o aumento da adesão da bactéria às células HeLa após choque com DOC 0,1% não é mediado por flagelo.

5.5 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Aeromonas* FRENTE AO DESOXICOLATO DE SÓDIO

Considerando que a presença de bile poderia alterar a suscetibilidade bacteriana a alguns antibióticos (KUS et al., 2011) e para verificar se uma possível resposta seria uniforme entre diferentes estirpes de *Aeromonas*, realizamos o teste de disco difusão para 11 bactérias deste gênero (Tabela 12).

TABELA 12. EFEITO DO DOC EM RELAÇÃO À SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS EM *Aeromonas*

Estirpes		Antimicrobiano									CO (E-test) MIC (µg/ml)	
		AMC 30µg	CRO 30µg	IPM 10µg	ATM 30µg	AK 30µg	CIP 5µg	SUT 25µg	C 2,6µg	PXB 300UI		
AVS	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MIC 4
312M	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	MIC 64
AVS 49H	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AVS 55M	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AC 8LM	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AC 359M	Ctl	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AH 27LM	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
AH 44	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AHLOC81	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AT2	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
AT7	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
AT LCR	Ctl	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
	Doc	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-

FONTE: O Autor (2019)

LEGENDA: AVS – *Aeromonas veronii* bv sobria; AC – *Aeromonas caviae*; AH – *Aeromonas hydrophila*; AT – *Aeromonas trota*. Ctl – ágar Müller-Hinton (controle); Doc – ágar Müller-Hinton com adição de DOC 0,1%; AMC – Amoxicilina+Ácido clavulânico; CRO – Ceftriaxona; IPM – Imipenem; ATM – Aztreonam; AK – Amicacina; CIP – Ciprofloxacino; SUT - Sulfametoxazol + Trimetoprima; C – Cloranfenicol; PXB – Polimixina; CO – Colistina. R – Resistente; I – Intermediário; S – Suscetível.

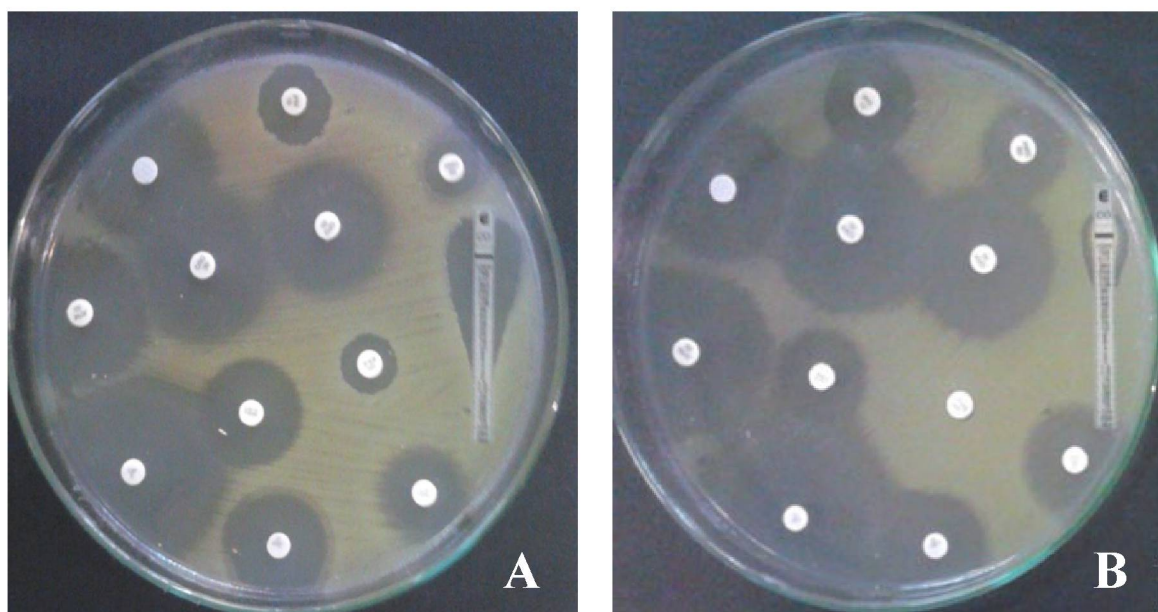
Diferente dos outros ensaios realizados nos quais foi feito um choque com DOC 0,1% por 60 ou 90 minutos, aqui as bactérias foram crescidas por aproximadamente 18 horas na ausência ou presença de DOC.

Pode-se observar que as estirpes *A. veronii* bv sobria 312M, 49H e 55M, *A. caviae* 8LM e 359M, *A. hydrophila* 44 e LOC81, *A. trota* 2 e LCR, antes sensíveis,

apresentaram resistência à Polimixina B quando crescidas em presença de DOC 0,1%, enquanto *A. hydrophila* 27LM e *A. trota* 7 permaneceram sensíveis. Isto sugere que a presença de DOC desencadeia respostas distintas entre as estirpes.

O E-teste, que determina a concentração inibitória mínima de um antibiótico frente a uma bactéria, foi realizado apenas para a estirpe *A. veronii* bv sobria 312M. Os resultados do E-teste para polimixina estão mostrados na Figura 6. Na ausência de DOC a concentração inibitória mínima foi de 4 µg/ml, e atingiu 64 µg/ml na presença do DOC 0,1% (Figura 6), confirmado o resultado obtido no teste de disco difusão.

FIGURA 6. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DA ESTIRPE *A. veronii* bv sobria 312M



FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: A. *A. veronii* bv sobria 312M testada em ágar Muller-Hinton (Oxoid); B. *A. veronii* bv sobria 312M testada em ágar Muller-Hinton (Oxoid) com adição de DOC 0,1%.

Polimixina B e colistina (polimixina E) são considerados como o último recurso no tratamento de infecções nosocomiais. Ambos, polimixina B e colistina, são agentes de ação bactericida rápida, que interagem com o LPS. O mecanismo de ação é semelhante à de um detergente, ocorre através da desestabilização da parede celular bacteriana pela alteração da permeabilidade celular e consequente morte celular bacteriana (ZAVASCK et al., 2007).

Tipicamente, a resistência à polimixina B é causada pelas interações entre o antibiótico e o lipídeo A do LPS. Essa resistência se deve a modulação mediada por dois componentes que são ativados por fatores ambientais como presença de cátions e

pH, que desencadeiam a ação de uma cascata de genes que, por sua vez, desenvolvem o fenótipo de resistência às polimixinas (GIRARDELLO; GALES, 2012). A bile também tem demonstrado ser um sinal que controla a expressão de fatores de colonização e virulência de várias bactérias entéricas (JESUS, 2005; HUNG e MEKALANOS, 2005; PROUTY et al., 2006)

Em estudo realizado com *E. coli* O157:H7 (EHEC), observou-se que a sua exposição aos sais biliares conferiu resistência à polimixina e, aparentemente, a bile pode estar agindo como um sinal ambiental que desencadeia mudanças na expressão gênica, que resultam em modificações da membrana externa dessas bactérias, permitindo o trânsito de peptídeos antimicrobianos catiônicos e possivelmente gerando a resistência a esses agentes (KUS et al., 2011). Também é possível que modificações da membrana externa estejam associadas com a resistência das estirpes de *Aeromonas* a polimixina quando expostas a bile. A anotação pelo RAST indica a presença de 4 genes associados com modificações do lipídeo A, que são variáveis e frequentemente reguladas por condições ambientais. As enzimas de modificação do lipídeo A podem modular a virulência de alguns patógenos Gram-negativos (RAETZ et al., 2007). Os genes citados no RAST e associados com a modificação de lipídeo A incluem PhoP, PhoQ, a proteína sensora BasS/PmrB e Epta, uma fosfoetanolamina transferase específica para o grupo fosfato 1 do *core* lipídeo A.

E. coli K-12 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium contém enzimas para a modificação do lipídeo A com fosfoetanolamina, L-Ara4N ou palmitato. As enzimas envolvidas são reguladas em resposta a modificações nas condições de crescimento. A ligação da fosfoetanolamina pela enzima EptA é induzida pela ativação do fator de transcrição PmrA pela exposição das células a estresse com ácido suave ou por mutação constitutiva. A modificação do lipídeo A pela adição do L-Ara4N é crítica para a resistência à polimixina, enquanto o papel da modificação pela fosfoetanolamina permanece incerta (REITZ et al., 2007). Entre os genes cuja expressão é ativada pelo regulador transcricional PhoP se encontram os que codificam um outro sistema de dois componentes designado PmrA-PmrB, onde PmrA é o regulador de resposta e PmrB a proteína quinase sensora (GROISMAN, 2001).

Um estudo que realizou um *screening* para genes regulados por PhoPQ em *Shigella flexneri* utilizando os perfis transcricionais e DNA *microarray* de mutantes com deleções dos reguladores transcricionais, mostrou que a expressão de PhoPQ está

envolvido na regulação da virulência, modificação do LPS, resistência a polimixina, adesão e invasão, além de outras características (LIN et al., 2018).

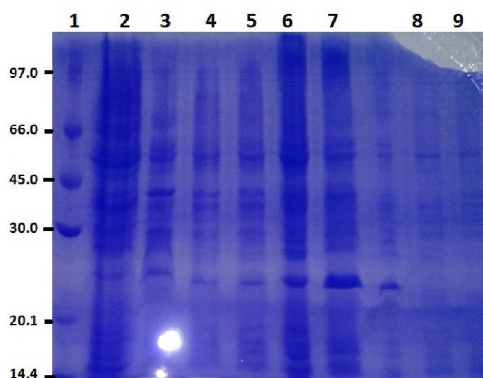
Os dados obtidos no transcriptoma de *A. veronii* bv sobria 312M, mostraram que o sistema de regulação de dois componentes PhoP-PhoQ tem sua expressão aumentada na presença de bile. Considerando que no draft genoma foram identificados genes associados com a modificação do lipídeo A, por sua vez relacionadas com a resistência a polimixina, e que as enzimas envolvidas neste processo são controladas por PhoPQ, estes estariam envolvidos também na resistência a polimixina observada em *A. veronii* bv sobria 312M crescida em presença de DOC. Assim como o observado em *Salmonella typhimurium*, na qual o sistema PhoP-PhoQ aumenta a transcrição de *pmrA-pmrB* e essa cascata de expressão do sistema regulador de dois componentes ativa genes do regulon PmrA–PmrB, que são responsáveis por modificações de LPS e resultam em resistência a polimixina (GUNN et al., 2002).

5.6 PERFIL PROTEICO

No intuito de verificar se ocorrem alteração no perfil proteico de *Aeromonas* após choque com DOC 0,1% foram realizadas eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE).

As análises em SDS-PAGE mostram os perfis proteicos das estirpes de *Aeromonas* na presença e ausência de DOC 0,1% (Figuras 7, 8 e 9).

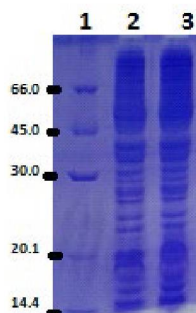
FIGURA 7. PERFIL PROTEICO DE *A. trota* E *A. hydrophila*



FONTE: O Autor (2019).

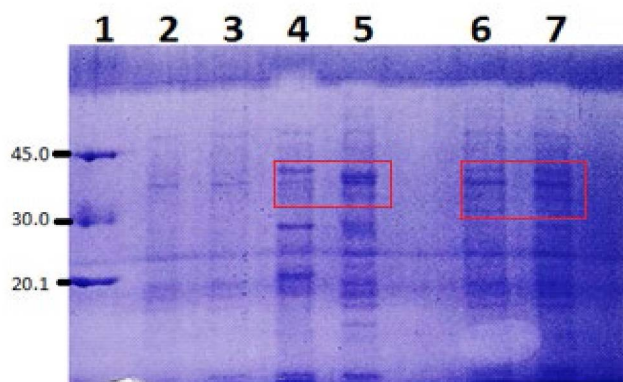
LEGENDA: Gel de poliacrilamida 12%, corado com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare)

1. Marcador baixo peso molecular LWM (GE Health Care); 2. *A. trota* 2 controle; 3. *A. trota* 2 na presença de DOC 0,1%; 4. *A. trota* 7 controle; 5. *A. trota* 7 na presença de DOC 0,1%; 6. *A. trota* LCR1999 controle; 7. *A. trota* LCR1999 na presença de DOC 0,1%; 8. *A. hydrophila* LOC81 controle; 9. *A. hydrophila* LOC81 na presença de DOC 0,1%.

FIGURA 8. PERFIL PROTEICO DE *A. veronii* bv sobria 49H

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: Gel de poliacrilamida 12%, corado com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare)
 1. Marcador baixo peso molecular LWM (GE Health Care); 2. *A. veronii sobria* 49H controle; 3. *A. veronii sobria* 49H na presença de DOC 0,1%.

FIGURA 9. PERFIL PROTEICO DE *A. caviae* E *A. hydrophila*

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: Gel de poliacrilamida 12%, corado com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare)
 1. Marcador baixo peso molecular LWM (GE Health Care); 2. *A. caviae* 8LM controle; 3. *A. caviae* 8LM na presença de DOC 0,1%; 4. *A. hydrophila* 44 controle; 5. *A. hydrophila* 44 na presença de DOC 0,1%; 6. *A. hydrophila* 27 LM controle; 7. *A. hydrophila* 27 LM na presença de DOC 0,1%.

Comparando-se os padrões das bandas dos perfis proteicos de diferentes estirpes de *Aeromonas*, pode-se observar que somente *A. hydrophila* 44 e 27LM apresentaram bandas de proteínas diferentes nas duas condições testadas. Estes resultados sugerem que a resposta à bile em *Aeromonas* não é uniforme como também observado na resposta à polimixina.

6 CONCLUSÕES

O genoma de *A. veronii* bv sobria 312M contém 4,57Mb, 58,6% de CG e 4.262 sequências codificadoras. Vários genes associados com o metabolismo de carbono, colicina, bem como genes de virulência clássicos incluindo adesinas, flagelos, enterotoxinas, *mucin-desulfating sulfatase*, necessários para o desenvolvimento de gastroenterite foram identificados no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, e estão relacionadas com a patogênese da diarreia. A expressão de alguns genes associados com virulência como hemolisina, e outros associados com adesão e motilidade foi verificada através de ensaios *in vitro*. Adicionalmente, foram encontrados hemolisinas, enzimas extracelulares e sistemas de secreção tipos II, III e VI e poderiam provocar um quadro mais grave da doença e inclusive disseminação da bactéria no organismo. A presença desses fatores sugere que essa bactéria apresenta elevado grau de virulência.

A exposição de *A. veronii* bv sobria 312M ao DOC 0,1% resultou na expressão diferencial de 31 genes:

- A maior parte de função desconhecida
- Alguns potencialmente associados com transporte de nutrientes
- Eliminação de produtos tóxicos
- Manutenção celular
- Modificação de membrana externa
- Super-expressão de bomba de efluxo associada com a eliminação de bile
- Promoveu aumento da adesão da bactéria as células HeLa
- Induziu a resistência da bactéria a polimixina

A resposta das estirpes de *Aeromonas* a bile é heterogênea.

REFERÊNCIAS

- ASAO, T.; KINOSHITA, Y.; KOZAKI, S.; UEMURA, T.; SAKAGUCHI, G. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 1, p. 122-127, 1984.
- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W. e JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.
- ABDELHAMED, H.; LAWRENCE, M. K.; WALDBIESER, G. Complete genome sequence data of multidrug-resistant *Aeromonas veronii* strain MS-18-37. **Data in Brief**, 2019.
- AL-BENWAN, K.; ABBOTT, S.; JANDA, M.; HUYS, G.; ALBERT, M. J. Cystitis Caused by *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2348–2350, 2007.
- ALAM, A.; TAM, V.; HAMIL, E.; DZIEJMAN, M. vttR_A and vttR_B Encode ToxR Family Proteins That Mediate Bile-Induced Expression of Type Three Secretion System Genes in a Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* Strain. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2554-2570, 2010.
- ALBARADO, L.; SAMPER, I.; GUZMÁN, M. *Aeromonas* spp. como agente causal de síndrome diarreico agudo en niños menores de 6 años de edad. **Kasmera**, v. 33, n. 1, 2005.
- ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDAR, K. A.; CHOPRA, A. K.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; FARUQUE, A. S. G.; ISLAM, M. S.; SACK, R. B.; MOLLBY, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3785–3790, 2000.
- ALPERI, A.; FIGUEIRAS, M. J.; INZA, I.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. **International Microbiology**, v. 11, p. 185-194, 2008.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n.3, p. 403-410. 1990.
- ANDERS S.; HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. R106, p. 1-12, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica nº 01/2013. **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**. Brasília, 17 de abril de 2013. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%B>

[A+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec](https://doi.org/10.1186/s12859-013-0213-7), acesso em 13 de março de 2018.

ASSIS, F. E. A.; WOLF, S.; SUREK, M.; DE TONI, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FARAH, S. M. S. S.; PICHETH, G. e 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**, v.8, p.1609-1614, 2014.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A. e ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 75, p. 1-15, 2008.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S.I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A.D.; PYSHKIN, A.V.; SIROTKIN, A.V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.A.; PEVZNER, P.A. 2012. SPADes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 55–477, 2012.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; DE MARQUI, A. B. T.; TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BARNETT, T. C.; KIROV, S. M.; STROM, M. S.; SANDERSON, K. *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. **Microbial Pathogenesis**, v. 13, n. 4, p. 241–247, 1997.

BEATSON, S. A.; DAS GRAÇAS DE LUNA, M.; BACHMANN, N. L.; ALIKHAN, N. F.; HANKS, K. R.; SULLIVAN, M. J.; WEE, B. A.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; DOS SANTOS, P. A.; DE MELO, J. T.; SQUIRE, D. J.; CUNNINGHAM, A. F.; FITZGERALD, J. R.; HENDERSON, I. R. Genome sequence of the emerging pathogen *Aeromonas caviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 1286–1287, 2011.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJJÁN, N.; ROMALDE, J. L.; FIGUERAS, M. J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 149-153, 2010.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n. 4, p. 371-388, 2013.

- BEAZ-HIDALGO, R.; HOSSAIN, M. J.; LILES, M. R.; FIGUERAS, M. J. Strategies to Avoid Wrongly Labelled Genomes Using as Example the Detected Wrong Taxonomic Affiliation for *Aeromonas* Genomes in the GenBank Database. **PlosOne**, v. 10, p. 1-13, 2015.
- BEGLEY, M.; GAHAM, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625–651, 2005.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; BEARD, S. E.; SCHNEIDER, J. Bile Salt Activation of Stress Response Promoters in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 39, p. 68–72, 1999.
- BOMAR, L.; STEPHENS, W. Z.; NELSON, M. C.; VELLE, K.; GUILLEMIN, K.; GRAF, J. Draft Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Hm21, a Symbiotic Isolate from the Medicinal Leech Digestive Tract. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, p. 1-2, 2013.
- BORREL, N.; FIGUERAS, M. J.; GUARRO, J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 103-108, 1998.
- BOYD, J. M.; DACANAY, A.; KNICKLE, L. C.; TOUHAMI, A.; BROWN, L.L.; JERICHO, M. H.; JOHNSON, S. C.; REITH, M. Contribution of Type IV Pili to the Virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1445-1455, 2008.
- BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, n. 104, p. 1-14, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BUSTOS, A. Y.; DE VALDEZ, G. F.; FADDA, S.; TARANTO, M. P. New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. **Food Research International**, v. 112, p. 250-262, 2018.
- CANALS, R.; RAMIRÉZ, S.; VILCHES, S.; HORSBURGH, G.; SHAW, J.; TOMÁS, J. M.; MERINO, S. Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 542-555, 2006.
- CARDOZO, F. A.; ZIMPEL, C. K.; GUIMARÃES, A. M.; PESSOA, A.; RIVERA, I. N. G. Draft Genome Sequence of Marine-Derived *Aeromonas caviae* CHZ306, a Potential Chitinase Producer Strain. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. 1-2, 2016.

- CARVALHO, M. C. C. G.; DA SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.
- CARTER, M. Q.; LOUIE, J. W.; FENG, D.; ZHONG, W.; BRANDL, M. T. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. **Food Microbiology**, v. 57, p. 81-9, 2006.
- CHAI, B.; WANG, H.; CHEN, X. Draft genome sequence of highmelanin-yielding *Aeromonas media* strain WS. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 6693–6694, 2012.
- CHAN, K. G.; CHIN, P. S.; TEE, K. K.; CHANG, C. Y.; YIN, W. F.; S. K. Y. Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* Strain L12, a QuorumSensing Strain Isolated from a Freshwater Lake in Malaysia. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 1-2, 2015.
- CHAO, C. M.; LAI, C. C.; TANG, H. J.; KO, W. C.; HSUEH, P. R. Biliary tract infections caused by *Aeromonas* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, p. 245-251, 2013.
- CHARETTE, S. J.; BROCHU, F.; BOYLE, B.; FILION, G.; TANAKA, K. H.; DEROME, N. Draft genome sequence of the virulent strain 01-B526 of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 722–723, 2012.
- CHEN, P. L.; TSAI, P. J. T.; CHEN, S.; LU, Y. C.; CHEN, H. M.; LEE, N. L.; LEE, C. C.; LI, W. L.; LI, C.; WU, C. J.; KO, W. C. *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of *Aeromonas veronii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, p. 618-624, 2015.
- CHENG, N. C.; HORNG, S. Y.; CHANG, S. C.; TANG, Y. B. Nosocomial infection of *Aeromonas hydrophila* presenting as necrotizing fasciitis. **Journal of the Formosan Medical**, v. 103, n. 1, p. 53-57, 2004.
- CHOPRA, A. K., PETERSON, J. W., XU, X. J., COPPENHAVER, D. H., HOUSTON, C. W. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 21, p. 357–377, 1996.
- CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 1129–1137, 1999.
- CHOPRA, A. K.; PETERSON, J. W. Conducting biodefense-related research in a highly regulated academic environment. **Drug Research**, v. 70, p. 239-245, 2009.
- CUTHBERTSON, L.; AHN, S. K.; NODWELL, J. R. Deglycosylation as a Mechanism of Inducible Antibiotic Resistance Revealed Using a Global Relational Tree for One-Component Regulators. **Chemistry & Biology**, v. 20, n. 2, p. 232-240, 2013.
- CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L.; COULTHURST, S.J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 51-62, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**: Approved Guideline-second Edition, M45–A2, Vol 30, No 19 (2011). Wayne, PA, USA: CLSI.

COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III Secretion Systems and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 535-549, 2007.

COLSTON, S. M.; NAVARRO, A.; MARTINEZ-MURCIA, A. J.; GRAFA, J. Draft Genome Sequence of *Aeromonas lusitana* sp. nov. Strain DSM 24905T, Isolated from a Hot Spring in Vila-Real, Portugal. **Genome Announcements**, v.6, n. 15, p. e00226-18, 2018.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; DE LEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 473-477, 1986.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 811-825, 2006.

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**, v. 13, p. 343-359, 2015.

CUI, H.; HAO, S.; AROUS, E. A Distinct Cause of Necrotizing Fasciitis: *Aeromonas veronii* Biovar Sobria. **Surgical infections**, v. 8, p. 523-528, 2007.

DACANAY, A.; BOYD, J. M.; FAST, M. D.; KNICKLE, L. C.; REITH, M. E. *Aeromonas salmonicida* type I pilus system contributes to host colonization but not invasion. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 199-206, 2010.

DALLAGASA, C. B.; SUREK, M.; VIZZOTTO, B. S.; PREDIGER, K. C.; MORIEL, B.; WOLF, S.; WEISS, V.; CRUZ, L. M.; ASSIS, F. E. A.; PALUDO, K. S.; REGO, F. G. M.; FARAH, S. M. S. S.; PICHETH, G.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Characteristics of an *Aeromonas trota* strain isolated from cerebrospinal fluid. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 109-112, 2018.

DEODHAR, L. P.; SARASWATHI, K.; VARUDKAR, A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 853-856, 1991.

DEEST, B. W. V.; FORDTRAN, J. S.; MORAWSKI, S. G.; WILSON, J. D. Bile salt and micellar fat concentration in proximal small bowel contents of ileectomy patients. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 4, n. 6, p. 1314-1324, 1968.

DILLIES, M. A.; AUBERT, J.; HENNEQUET-ANTIER, C.; JEANMOUGIN, M.; SERVANT, N.; KEIME, C.; MAROT, G.; CASTEL, D.; ESTELLE, J.;

- GUERNEC, G.; JAGLA, B.; JOUNEAU, L.; LALOË, D.; LE GALL, C.; SCHAËFFER, B.; LE CROM, S.; GUEDJ, M.; JAFFRÉZIC, F.; FRENCH STATOMIQUE CONSORTIUM. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n.6, p. 671-83, 2013.
- DWIVEDI, M.; MISHRA, A.; PRASAD, A.; AZIM, A.; SINGH, R. K.; BARONIA, A. K.; PRASAD, K. N.; DWIVEDI, U. N. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 547-548, 2008.
- EKBLON, R.; WOLF, J. B. W. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 9, p. 1026-1042, 2014.
- ELAHI, E.; RONAGHI, M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 255, p. 211-219, 2004.
- EROVA, T. E.; KOSYKHB, V. G.; SHA, J.; CHOPRA, A. K. DNA adenine methyltransferase (Dam) controls the expression of the cytotoxic enterotoxin (act) gene of *Aeromonas hydrophila* via tRNA modifying enzyme-glucose-inhibited division protein (GidA). **Gene**, v. 498, p. 280-287, 2012.
- ESSERS, B.; BURNENS, A. P.; LANFRANCHINI, F.M.; SOMARUGA, S.G.; VON VIGIER, R. O.; SCHAAD, U. B.; AEBI, C.; BIANCHETTI, O. Acute community-acquired diarrhea requiring hospital admission in Swiss children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 192-196, 2000.
- ESTELLER, A. Physiology of bile secretion. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 37, p. 5641-5649, 2008.
- FABICH, A. J.; JONES, S. A.; CHOWDHURY, F. Z.; CERNOSEK, A.; ANDERSON, A.; SMALLEY, D.; MCHARGUE, J. W.; HIGHTOWER, G. A.; SMITH, J. T.; AUTIERI, S. M.; LEATHAM, M. P.; LINS, J. J.; ALLEN, R. L.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S.; CONWAY, T. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1143-1152, 2008.
- FARMER III, J. J.; ARDUINO, M. J.; HICKMAN-BRENNER, S. W. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*. ed.3, v. 6, p. 564-596, 2006.
- FORN-CUNÍ, G.; TOMÁS, J. M.; MERINO, S. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* Strain AH-3 (Serotype O34). **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p.1-2, 2016.
- FOSSE, T. *Aeromonas, Vibrio and Plesiomonas*. In COURVALIN, P., LECLERCQ, R.; RICE, L.B. **Antibiogram**. Portland, Oregon: ESKA Publishing, ASM Press, p.509-518, 2010.

- FUCHS, T. M.; EISENREICH, W.; HEESEMAN, J.; GOEBEL, W. Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 435-462, 2012.
- GALINDO, C. L.; SHA, J.; FADL, A. A.; PILLAI, L. L.; CHOPRA, A. K. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 13-26, 2006.
- GAVÍN, R.; RABAAN, A. A.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; GRYLLOS, I.; SHAW, J. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.43, n.2, p. 383-397, 2002.
- GAVÍN, R.; MERINO, S.; ALTARRIBA, M.; CANALS, R.; SHAW, J. G.; TOMÁS, J. M. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p.77-83, 2003.
- GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Polymyxins resistance: old antimicrobials, last therapeutic options. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 2, p. 66-69, 2012.
- GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 81-91, 2007.
- GRACEY, M.; BURKE, V.; ROBINSON, J. *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p 1304-1305, 1982.
- GRAHAM, D. R. M.; ELLIOT, S. T.; VAN EYK, J. E. V. Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. **The Journal of Physiology**, v. 563, n. 1, p. 1-9, 2005.
- 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**, v. 80, n. 14, p. 4162-4183, 2014.
- GRÖBNER, S.; BISSINGER, A. L.; RAIBLE, A.; HEEG, P.; AUTENRIETH, I. B.; SHMIDT, S. M. Severe diarrhoea caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* in a patient with metastasied GIST. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 277-279, 2007.
- GROISMAN, E. A. The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 6, p. 1835-1842, 2001.
- GUERRA, I. M. F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A. P. L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S.

Aeromonas associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 638-643, 2007.

GUIZELINI, D.; RAITTZ, R. T.; CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O. GFinisher: a new strategy to refine and finish bacterial genome assemblies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34963, 2016.

GUNN, J. S.; KRUEGER, J.; KIM, K.; GUO, L.; HACKETT, M.; MILLER, S. I. PmrA–PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1171-1182, 1998.

GUNN, J. S. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 907–913, 2000.

GUPTA, S.; CHOWDHURY, R. Bile Affects Production of Virulence Factors and Motility of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 3, p. 1131-1134, 1997.

HADI, N.; YAN, Q.; BARNETT, T. C.; TABEL, M. B.; KIROV, S. M.; SHAW, J. G. Bundle-Forming Pilus Locus of *Aeromonas veronii* bv. Sobria. **Infection and Immunity**, p. 1351–1360, 2012.

HAN, J. E.; KIM, J. H.; CHORESCA, C.; SHIN, S. P.; JUN, J. W.; PARK, S. C. Draft Genome Sequence of a Clinical Isolate, *Aeromonas hydrophila* SNUFPC-A8, from a Moribund Cherry Salmon (*Oncorhynchus masou masou*). **Genome Announcements**, v.1, n. 1, p. 1-2, 2013.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 692–744, 2004.

HERNÁNDEZ, S. B.; CAVA, F.; PUCCIARELLI, G.; GARCÍA-DEL-PORTILLO, F.; DE PEDRO, M. A.; CASADESÚS, J. Bile-induced peptidoglycan remodelling in *Salmonella enterica*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 1081–1089, 2015.

HIRANSUTHIKUL, N.; TANTISIRIWAT, W.; LERTUTSAHAKUL, K.; VIBHAGOOL, A.; BOONMA, P. Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. e93–6, 2005.

HOCK, J. A. Two-component and phosphorelay signal transduction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 165-170, 2000.

HOFER, E.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; CAVALCANTI, V. O.; LIMA, N. V.; HENRIQUES, M. F. C. M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.

HONEIN, K.; JAGODA, S. S. S. D. S.; ARULKANTHAN, A.; USHIO, H.; ASAKAWAB, S. Draft Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* Strain Ae25,

Isolated from a Septicemic Moribund Koi Carp (*Cyprinus carpio*) in Sri Lanka. **Genome Announcements**, v. 6, n. 5, e01523-17, 2018.

HORNEMAN, A. J.; ALI, A.; ABBOTT, S. L. *Aeromonas*. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology Press: Washington D.C., 9ed., v.1, p.716-721, 2007.

HOWARD, S. P.; GARLAND, W. J.; GREEN, M. J.; BUCKLEY, J. T. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2869-2871, 1987.

HUNG, D. T.; MEKALANOS, J. J. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 3028–3033, 2005.

IMAMURA, T., MURAKAMI, Y.; NITTA, H. *Aeromonas sobria* serine protease (ASP): a subtilisin family endopeptidase with multiple virulence activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1055–1068, 2017.

ISONHOOD, J.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 575-582, 2002.

JAGODA, S. S. S. D.; HONEIN, K.; ARULKANTHAN, A.; USHIO, H.; ASAKAWA, S. Genome sequencing and annotation of *Aeromonas veronii* strain Ae52, a multidrug-resistant isolate from septicemic gold fish (*Carassius auratus*) in Sri Lanka. **Genomics Data**, v, 11, p. 46–48, 2017.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n.1, p. 35-73, 2010.

JESUS, M. C.; URBAN, A. A.; MARASIGAN, M. E.; FOSTER, D. E. B. Acid and bile-salt stress of Enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.192, p.1430-1440, 2005.

KALENDAR, R., MUTERKO, A., SHAMEKOVA, M., ZHAMBAKIN, K. In silico PCR tools a fast primer, probe and advanced searching. **Methods in Molecular Biology**, v. 1620, p. 1-31, 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7060-5_1

KANG, Y.; PAN, X.; XU, Y.; SIDDIQUI, S. A.; WANG, C.; SHAN, X.; QIAN, A. Complete genome sequence of the fish pathogen *Aeromonas veronii* TH0426 with potential application in biosynthesis of pullulanase and chitinase. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 81-82, 2016.

KHAJANCHI, B. K.; FADL, A. A.; BORCHARDT, M. A.; BERG, R. L.; HORNEMAN, A. J.; STEMPER, M. E.; JOSEPH, S. W.; MOYER, N. P.; SHA, J.; CHOPRA, A. K. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of

water-to-human transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 2313–2325, 2010.

KHAJANCHI, B. K.; KOZLOVA, E. V.; SHA, J.; POPOV, V. L.; CHOPRA, A.K. The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v. 158, p. 259–271, 2012.

KIM, J. J.; KHAN, W. I. Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections. **Pathogens**, v. 2, p. 55-70, 2013.

KIROV, S. M.; O'DONOVAN, L. A.; SANDERSON, K. Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species. **Infection and Immunity**, v. 67, n, 18, 5447-5454, 1999.

KIROV, S. M.; BARNETT, T. C.; PEPE, C. M.; STROM, M. S.; ALBERT, M. J. Investigation of the Role of Type IV *Aeromonas* Pilus (Tap) in the Pathogenesis of *Aeromonas* Gastrointestinal Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4040-4048, 2000.

KIROV, S. M.; TASSELL, B. C.; SEMMLER, A. B.; O'DONOVAN, L. A.; RABAAN, A. A.; SHAW, J. G. Lateral flagella and Swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v.184, n. 2, p.547-555, 2002.

KIROV, S. M. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.224, p.151-159, 2003.

KIROV, S. M., CASTRISIOS, M.; SHAW, J. G. *Aeromonas* Flagella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1939-1945, 2004.

KOSTAKIOTI, M.; NEWMAN, C. L.; THANASSI, D. G.; STATHOPOULOS, C. Mechanisms of Protein Export across the Bacterial Outer Membrane. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4306–4314, 2005.

KRISTOFFERSEN, S. M.; RAYNUM, S.; TOURASSE, N. J.; OKSTAD, O. A.; KOLSTO, A. B.; DAVIES, W. Low Concentrations of Bile Salts Induce Stress Responses and Reduce Motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570. **Molecular Biology of Pathogens**, v. 198, n. 14, p. 5302-5313, 2007.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 16-19, 1989

KUMRU, S.; TEKEDAR, H. C.; GRIFFIN, M. J.; WALDBIESER, G. C.; LILES, M. R.; SONSTEGARD, T.; SCHROEDER, S. G.; LAWRENCE, M. L.; KARSIA, A. Draft Genome Sequence of Fish Pathogen *Aeromonas bestiarum* GA97-22. **Genome Announcements**, v. 6, n. 24, p.1-2, 2018.

- KUS, J. V.; GEBREMEDHIN, A.; DANG, V.; TRAN, S.; SERBANESCU, A.; FOSTER, D.B. Bile Salts Induce Resistance to Polymyxin in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 17, p. 4509–4515, 2011.
- KUZNETSOVA, E.; NOCEK, B.; BROWN, G.; MAKAROVA, K.S. Functional diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n.30, p.18678–18698, 2015.
- KWONG, J. C.; MCCALLUM, N.; SINTCHENKO, V.; HOWDEN, B. P. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. **Pathology**, v. 47, n. 3, p. 199-210, 2015.
- LAMY, B.; KODJO, A.; LAURENT, F.; COLBVH STUDY GROUP. Prospective Nationwide Study of *Aeromonas* Infections in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1234-1237, 2009.
- LAMY, B.; LAURENT, F.; VERDIER, I.; DECOUSSER, J. W.; LECAILLON, E.; MARCHANDIN, H.; ROGER, F.; TIGAUD, S.; MONTCLOS, H.; COLBVH STUDY GROUP.; KODJO, A. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 1, p. 9-14, 2010.
- LAMY, B.; KODJO, A.; LAURENT, F.; COLBVH STUDY GROUP. Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 1-5, 2011.
- LERTPIRIYAPONG, K.; GAMAZON, E. R.; FENG, Y.; PARK, D. S.; PANG, J. *Campylobacter jejuni* Type VI Secretion System: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization. **PLoS ONE**, v.7, n.8, e42842, 2012.
- LI, L.; DU, Z. Z.; SUN, X.; SHAO, X. G.; LI, J. G.; ZHANG, L. X.; WANG, Y. M.; WU, Q. Severe pneumonia caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria*: a case report and review of the literature. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi**, v. 31, p. 736-739, 2008.
- LI, Y.; LIU, Y.; ZHOU, Z.; HUZHANG, HUANG, H.; REN, Y.; ZHANG, Y.; LI, G.; ZHOU, Z.; WANG, L. Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3389–3390, 2011.
- LI, T.; CHIANG, J. Y. L. Bile Acid Signaling in Liver Metabolism and Diseases. **Journal of Lipids**, v. 2012, p. 1-9, 2015.
- LIN, Z.; CAI, X.; CHEN, M.; YE, L.; WU, Y.; WANG, X.; LV, Z.; SHANG, Y.; QU, D. Virulence and Stress Responses of *Shigella flexneri* Regulated by PhoP/PhoQ. **Front. Microbiol.**, v.8, p.2689, 2018.
- LONGA, A.; VIZCAYA, L.; NIEVES, B.; BRAVO, L.; MORIER, L.; PÉREZ-SCHAEL, I.; CABRERA, L.E. Factores de virulencia asociados a la

enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. **Revista Cubana Medicina Tropical**, v. 57, n. 2, p. 85-91, 2005.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review Biochemistry**, v. 70, p. 437-473, 2001.

MARTIN-CARNAHAN, M.; JOSEPH, S. W. Family I. Aeromonadaceae. Order XII. **Aeromonadales ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, p. 556-578. Edited by G. M. Garrity. New York: Springer, 2005.

MARTINO, M.E.; FASOLATO, L.; MONTEMURRO, F.; ROSTEGHIN, M.; MANFRIN, A.; PATARNELLO, T.; NOVELLI, E.; CARDOZZO, B. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotypic, and presence of putative virulence genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n. 14, p. 4986–5000, 2011.

MCCMAHON, M. A.; WILSON, I. G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.22, p.155-62, 2001.

MELHUS, A. First Documented Case of *Aeromonas veronii* Biovar Sobria Infection in Northern Europe. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, p. 218-219, 2002.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; MAZZOLLA, R.; FARINELLI, S.; D'ALO, F.; VITALI, M.; BISTONI, F. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 727–730, 2003.

MERINO, S.; AGUILAR, A.; NOGUERAS, M. M.; REGUE, M.; SWIFT, S.; TOMÁS, J. M. Cloning, Sequencing, and Role in Virulence of Two Phospholipases (A1 and C) from Mesophilic *Aeromonas* sp. Serogroup O:34. **Infection and Immunity**, v.67, n.8, p. 4008–4013, 1999.

MERINO, S.; SHAW, J. G.; TOMÁS, J. M. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 263, p. 127-135, 2006.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MOBLEY, H. Redefining virulence of pathogens. **Microbe**, v. 10, p. 239-246, 2015.

MORANDI, A.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J. P.; GRAF, J. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6561-6564, 2005.

MORIEL, B.; CRUZ, L. M.; DALLAGASSA, C. B.; FAORO, H.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; REGO, F. G. M.; PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Draft

Genome Sequence of *Aeromonas caviae* 8LM, Isolated from Stool Culture of a Child with Diarrhea. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p.1, 2015.

MORIYA, Y.; ITOH, M.; OKUDA, S.; YOSHIZAWA, A. C.; KANEHISA, M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W182–W185, 2007.

MORRIS, J.G.; HORNEMAN, A. **Aeromonas infections**, 2019. Disponível em <https://www.uptodate.com/contents/aeromonas-infections>, acesso em 10 de março de 2019.

MOYER, N. P.; Clinical Significance of *Aeromonas* Species Isolated from Patients with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 2044-2048, 1987.

MÜLLER, C. A.; BROZ, P.; CORNELIS, G. R. The type III secretion system tip complex and translocon. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1085-1095, 2008.

NAGARAJAN, N.; POP, M. Sequence assembly demystified. **Nature Reviews**, v. 14, p. 157-167, 2013.

NAJIMI, M.; LEMOS, M. L.; OSORIO, C. R. Identification of heme uptake genes in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*. **Archives of Microbiology**, v. 190, p. 439-449, 2008.

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

NICKERSON, K. P.; CHANIN, R. B.; SISTRUNK, J. R.; RASKO, D. A.; FINK, P. J.; BARRY, E. M.; NATARO, J. P.; FAHERTYA, C. S. Analysis of *Shigella flexneri* Resistance, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile in Response to Bile Salts. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 6, p. 1-18, 2017.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 769-781, 2009.

NOJIMOTO, I. T. I.; BEZANA, C. S. C.; DO CARMO, C.; VALADÃO, L. M.; CARRIJO, K. M. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1997. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.5, n.30, p.385-388, 1997.

NORTHFIELD, T. C.; MCCOLL, I. Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. **Gut**, v. 14, n. 7, p. 513-518, 1973.

OUDEKIRK, J. P.; BEKHOR, D.; TURETT, G. S.; MURALI, R. *Aeromonas* Meningitis Complicating Medicinal Leech Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. e36-37, 2004.

- OSAWA, R.; YAMAI, S. Production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* enhanced by conjugated bile acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 3023-3025, 1996.
- OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v.42, D206-214, 2014.
- PADILLA, J.C.; BUSTOS, P.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; SÁNCHEZ-VARELA, A.; PALMA-MARTINEZ, I.; ARZATE-BARBOSA, P.; GARCÍA-PÉREZ, C. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, M. J.; GONZÁLEZ, V.; GUO, X. Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* Strain 429865 INP, Isolated from a Mexican Patient. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 1-2, 2015.
- PANG, M.; JIANG, J.; XIE, X.; WU, Y.; DONG, Y.; KWOK, A. H. Y.; ZHANG, W.; YAO, H.; LU, C.; LEUNG, F. C.; LIU, Y. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. **Scientific Reports**, v. 5, n. 09833, p. 1-15, 2015.
- PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. Clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v.62, p.109-118, 2011.
- PAVAN, M. E.; PAVAN, E. E.; LÓPEZ, N. I.; LEVIN, L.; PETTINARIA, M. J. Genome Sequence of the Melanin-Producing Extremophile *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* Strain 34mel^T. **Genome Announcements**, v.1, n. 5, p. 1-2, 2013.
- PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v.152, p.1-10, 1997.
- PEREIRA, C. S.; AMORIM, S. D.; SANTOS, A. F. M.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; RODRIGUES, D. P. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 179-182, 2008.
- PFEIFFER, F.; ZAMORA-LAGOS, M. A.; BLETINGER, M.; YEROSLAVIZ, A.; DAHL, A.; GRUBER, S.; HABERMANN, B. H. The complete and fully assembled genome sequence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* and its comparative analysis with other *Aeromonas* species: investigation of the mobilome in environmental and pathogenic strains. **BMC Genomics**, v 19, p. 1-15, 2018.
- PODOLSKI, D. K.; ISSELBACHER, K. J. Composition of Human Colonic Mucin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 142-153, 1983.
- POPE, L. M.; REED, K.; PAYNE, S. M. Increased Protein Secretion and Adherence to HeLa Cells by *Shigella* spp. following Growth in the Presence of Bile Salts. **Infection and Immunity**, v.63, n. 9, p. 3642-3648, 1995.

- PRIDGEON, J. W.; ZHANG, D.; ZHANG, L. Complete Genome Sequence of a Moderately Virulent *Aeromonas hydrophila* Strain, pc104A, Isolated from Soil of a Catfish Pond in West Alabama. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 1-2, 2014.
- PREDIGER, K. C.; SUREK, M.; DALLAGASSA, C. B.; ASSIS, F. E. A.; PIANTAVINI, M. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FARAH, S. M.; ALBERTON, D.; FADEL-PICHETH, C. M. Utilization of carbon sources by clinical isolates of *Aeromonas*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 359–364, 2017.
- PROFT, T.; BAKER, E.N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, 613-635, 2009.
- PROUTY, A. M.; BRODSKY, E.; FALKOW, S.; GUNN, J.S. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. **Microbiology**, v.150, p. 775–783, 2004.
- PROUTY, A. M.; BRODSKY, I. E.; MANOS, J.; BELAS, R.; FALKOW, S.; GUNN, J.S. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. **Pathogens and Disease**, v. 41, n. 2, p. 177–185, 2006.
- PUTHUCHEARY, S. D.; PUAH, S. M.; CHUA, K. H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2012.
- QAMAR, F. N.; NISAR, M. I.; QUADRI, F.; SHAKOOR, S.; SOW, S.O.; NASRIN, D.; BLACKWELDER, W. C.; WU, Y.; FARAG, T.; PANCHALINGHAM, S.; SUR, D.; QURESHI, S.; FARUQUE, A. S. G.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; BREIMAN, R.F.; BASSAT, Q.; TAMBOURA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; AHMED, S.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; MANDOMANDO, I.; TENNANT, S.M.; KOTLOFF, K. L.; LEVINE, M.M.; ZAIDI, A.K.M. *Aeromonas*-Associated Diarrhea in Children Under 5 Years: The GEMS Experience. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n; 5, p. 774 – 780, 2016.
- RAETZ, C. R.; REYNOLDS, C. M.; TRENT, M. S.; BISHOP, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 295-329, 2007.
- RASMUSSEN-IVEY, C. R.; FIGUERAS, M. J.; MCGAREY, D.; LILES, M. R. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1-10, 2016.
- REITH, M. E.; SINGH, R. K.; CURTIS, B.; BOYD, J. M.; BOUEVITCH, A.; KIMBALL, J.; MUNHOLLAND, J.; MURPHY, C.; SARTY, D.; WILLIAMS, J.; NASH, J. H.; JOHNSON, S. C.; BROWN, L. L. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. **BMC Genomics**, v. 9, n. 427, p. 1-15, 2008.

ROBERTS, M. T. M.; ENOCH, D. A.; HARRIS, K. A.; KARAS, J. A. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 241–243, 2006.

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.; BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A. G.; ROTH, T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 21, p. 348-352, 2011.

RUSK, N. Torrents of sequence. **Nature Methods**, v. 8, n. 44, 2011.

RYAN, L.; HIGGINS, G.; DOYLE, M. *Aeromonas* species endogenous endophthalmitis. **JMM Case Reports**, v. 4, n. 5, p. 1-3, 2017.

SAAVEDRA, M. J.; FIGUERAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p. 2481-2487, 2006.

SAKANAKA, A.; KUBONIWA, M.; TAKEUCHI, H.; HASHINO, E.; AMANO, A. Arginine-Ornithine Antiporter ArcD Controls Arginine Metabolism and Interspecies Biofilm Development of *Streptococcus gordonii*. **Journal of Biological Chemistry**, v.290, n. 35, p. 2185-2198, 2015.

SANA, T. G.; FLAUGNATTI, N.; LUGO, K. A.; LAM, L. H.; JACOBSON, A.; BAYLOT, V.; DURAND, E.; JOURNET, L.; CASCALES, E.; MONACK, D. M. *Salmonella Typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. **PNAS Published online**, v.8, p. E5044–E5051, 2016.

SENDEROVICH, Y.; KEN-DROR, S.; VAINBLAT, I.; BLAU, D.; IZHAKI, I.; HALPEM, M. A Molecular Study on the Prevalence and Virulence Potential of *Aeromonas* spp. Recovered from Patients Suffering from Diarrhea in Israel. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2012.

SESHADRI, R.; JOSEPH, S.W.; CHOPRA, A. K.; SHA, J.; SHAW, J.; GRAF, J.; HAFT, D.; WU, M.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; MADUPU, R. M.; TALLON, L.; KIM, M.; JIN, S.; VUONG, H.; COLIN STINE, O.; ALI, A.; HORNEMAN, A. J.; HEIDELBERG, J.F. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8272-8282, 2006.

SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; CHOPRA, A. K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient

mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infection and Immunity**, v.70, n.4, p.1924-1935, 2002.

SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; FADL, A. A.; OLANO, J. P.; HOUSTON, C. W.; PETERSON, J. W.; CHOPRA, A. K. Molecular Characterization of a Glucose-Inhibited Division Gene, *gidA*, That Regulates Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.1084-1095, 2004.

SHA, J.; PILLAI, L.; FADL, A. A.; GALINDO, C. L.; EROVA, T. E.; CHOPRA, A. K. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6446-6457, 2005.

SHA, J.; EROVA, T. E.; ALYEA, R. A.; WANG, S.; OLANO, J. P.; PANCHOLI, V.; CHOPRA, A. K. Surface-Expressed Enolase Contributes to the Pathogenesis of Clinical Isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 9, p. 3095-3107, 2009.

SHOKRALLA, S.; SPALL, J. L.; GIBSON, J. F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1794-1805, 2012.

SINHA, S.; SHIMADA, T.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S. K.; YAMASAKI, S.; TAKIDA, Y.; NAIR, G. B. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 527–534, 2004.

SISTRUNK, J. R.; NICKERSON, K. P.; CHANIN, R. B.; RASKO, D. A.; FAHERTY, C. S. Survival of the Fittest: How Bacterial Pathogens Utilize Bile to Enhance Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 819-836, 2016.

STEIN, L. Genome annotation: from sequence to biology. **Nature Reviews**, v. 2, p. 493-503, 2001.

SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; SHA, J.; WANG, S.; EROVA, T. E.; FADL, A. A.; FOLTZ, S. M.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. A. Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System from a Clinical Isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v.44, n.4, p.344-361, 2008.

SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; KIRTLEY, M. L.; CHOPRA, A. K. Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. **Microbiology**, v.156, p.3678–3688, 2010.

SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; EROVA, T. E.; SHA, J.; HORNEMAN, A. J.; CHOPRA, A. K. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 155–168, 2010b.

SUREK, M.; VIZZOTTO, B. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DALLAGASSA, C. B.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Identification and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhoea and healthy controls. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59 p.373-374, 2010.

SUREK, M. *Aspectos da adesão de Aeromonas a linhagens celulares imortalizadas*. 2014. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2014.

TEKEDAR, H. C.; WALDBEISER, G. C.; KARSI, A.; LILES, M. R.; GRIFFIN, M. J.; VAMANTA, S.; SONSTEGARD, T.; HOSSAIN, M.; SCHROEDER, S. G.; KHOO, L.; LAWRENCE, M.L. Complete genome sequence of a channel catfish epidemic isolate, *Aeromonas hydrophila* strain ML09-119. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, p. -2, 2013.

TEKEDAR, H. C.; KUMRU, S.; KARSI, A.; WALDBIESER, G. C.; SONSTEGARD, T.; SCHROEDER, S. G.; LILES, M. R.; GRIFFIN, M. J.; LAWRENCE, M. L. Draft Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* TN97-08. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p.1-2, 2016.

TENA, D.; GONZÁLEZ-PRAETOURIUS, A.; GIMENO, C.; PÉREZ-POMATA, M. T.; BISQUERT, J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 25, n. 4, p.:235-241, 2007.

TEUNIS, P.; FIGUERAS, M. Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic *Aeromonas* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1395, 2016.

TOMÁS, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1-22, 2012.

VAN DIJK, E. L.; AUGER, H.; JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 3, n. 9, 2014.

VAN FAASSEN, A.; HAZEN, M. J.; VAN DEN BRANDT, P. A.; VAN DEN BOGAARD, A. E.; HERMUS, R. J. J.; JANKNEGHT, R. A. Bile acids and pH values in total feces and in fecal water from habitually omnivorous and vegetarian subjects. **The American Journal Clinical Nutrition**, v.58, n. 6, p. 917–922, 1993.

VALDES, N.; ESPINOZA, C.; SANHUEZA, L.; GONZALEZ, A.; CORSINI, G.; TELLO, M. Draft genome sequence of the Chilean isolate *Aeromonas salmonicida* strain CBA100. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, p. 1-4, 2015

VINCENT, A. T.; TANAKA, K. H.; TRUDEL, M. V.; FRENETTE, M.; DEROME, N.; CHARETTE, S. J. Draft genome sequences of two *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates harboring plasmids conferring antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, P. 1-4, 2015.

- VINCENTE, A. T.; CHARETTE, S. J. Completion of genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 reveals how sequencing technologies can influence sequence quality and result interpretations. **New Microbes and New Infections**, v. 25, n. C, 2018.
- 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**, v. 9, n. 5, p. 552-555, 2003.
- VIZZOTTO, B. V. Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2009.
- VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. **Infection**, v. 35, n.2, p. 59-64, 2007.
- WANG, G.; CLARK, C. G.; LIU, C.; PUCKNELL, C.; MUNRO, C. K.; KRUK, T. M. A. C.; CALDEIRA, R.; WOODWARD, D. L.; RODGERS, F. G. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, n. 3, p. 1048– 1054, 2003.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews – Genetics**, v.10, n.1, p.57-63, 2009.
- WANG, H. C.; KO, W. C.; SHU, H. Y.; CHEN, P. L.; WANG, Y. C.; WU, C. J. Genome Sequence of *Aeromonas taiwanensis* LMG 24683T, a Clinical Wound Isolate from Taiwan. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 1-2, 2014.
- WATERS, V. L.; CROSA, J. H. Colicin V virulence plasmids. **Microbiology Reviews**, v. 55, p. 437-450, 1991.
- WHITFIELD, C.; VALVANO, M. A. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v. 35, p. 135-246, 1993.
- WORTHAM, B. W.; OLIVEIRA, M. A.; PATEL, C. N. Polyamines in Bacteria: Pleiotropic Effects yet Specific Mechanisms. In: PERRY R.D., FETHERSTON J.D. (eds) *The Genus Yersinia*. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, v. 603. Springer, New York, NY, 2007.
- WU, C. J.; WANG, H. C.; CHEN, C. S.; SHU, H. Y.; KAO, A. W.; CHEN, P. L.; KO, W. C. Genome Sequence of a Novel Human Pathogen, *Aeromonas aquariorum*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 4114-4115, 2012.
- YANG, Y.; OISHI, S.; MARTIN, C. E.; SEEBERGER, P. H. Diversity-oriented Synthesis of Inner Core Oligosaccharides of the Lipopolysaccharide of Pathogenic Gram-negative

Bacteria. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 16, p. 6262-6271, 2013.

YUAN, J.; JIN, F.; GLATTER, T.; SOURJIK, V. Osmosensing by the bacterial PhoQ/PhoP two-component system. **PNAS**, v. 114, n. 50, p. E10792-10798, 2017.

ZANKARI, E. A.; HASMAN, H.; COSENTINO, S.; VESTERGAARD, M.; RASMUSSEN, S.; LUND, O; AARESTRUP, F. M.; LARSEN, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2640-2644, 2012.

ZAVASCKI, A. P.; GOLDANI, L. Z.; NATION, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p. 1206–1215, 2007.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, p. 821-829, 2008.