

Laboratório Nacional de Computação Científica  
Programa de Pós Graduação em Modelagem Computacional

**Biologia computacional aplicada à análise de dados de  
microarranjos do genoma da bactéria marinha *Vibrio  
parahaemolyticus* em presença de N-acetilglicosamina.**

Por

**Antônio Alves dos Santos Neto**

PETRÓPOLIS, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**BIOLOGIA COMPUTACIONAL APLICADA À ANÁLISE DE  
DADOS DE MICROARRANJOS DO GENOMA DA BACTÉRIA  
MARINHA *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EM PRESENÇA DE  
N-ACETILGLICOSAMINA.**

**Antônio Alves dos Santos Neto**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO LABORATÓRIO  
NACIONAL DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA COMO PARTE DOS REQU-  
SITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS EM MODELAGEM COMPUTACIONAL

Aprovada por:

---

Prof. Fabiano Lopes Thompson, Dr.  
(Presidente)

---

Prof. Cláudio Galuppo Diniz, Dr.

---

Prof. Marisa Fabiana Nicolás, Ph.D

PETRÓPOLIS, RJ - BRASIL  
MARÇO DE 2010

Santos Neto, Antônio Alves dos

S237b biologia computacional aplicada à análise de dados de microarranjos do genoma da bactéria marinha *vibrio parahaemolyticus* em presença de n-acetilglicosamina. / Antônio Alves dos Santos Neto. Petrópolis, RJ. : Laboratório Nacional de Computação Científica, 2010.

14, 76 p. : il.; 29 cm

Orientador: Fabiano Lopes Thompson

Dissertação (M.Sc.) – Laboratório Nacional de Computação Científica, 2010.

1. Biologia Molecular. 2. *Vibrio parahaemolyticus*. 3. N-acetilglicosamina. 4. Microarranjos. 5. Expressão Gênica . I. Thompson, Fabiano Lopes . II. LNCC/MCT. III. Título.

CDD 572.865

“Às vezes eu penso que o sinal mais forte da existência de vida inteligente em outra parte do universo, é que eles nunca entraram em contato conosco.” Bill Watterson

## **Dedicatória**

A minha mãe, Maringá, aos meus irmãos  
Marco e Sábatha por todo carinho e apoio!

Em memória do meu pai, Antônio.

# Agradecimentos

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por todo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço também ao meu orientador Fabiano Thompson por todo apoio, paciência e dedicação. Assim com a Eidy Santos por toda ajuda durante a elaboração da dissertação. E agradeço também a todos os funcionários do LNCC pela ajuda.

Agradeço a minha família pelo ajuda e carinho. Agradeço as todos meus amigos pelo apoio durante este período em especial a Sicília Judice por todo carinho e dedicação durante esta fase.

Resumo da Dissertação apresentada ao LNCC/MCT como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

**BIOLOGIA COMPUTACIONAL APLICADA À ANÁLISE DE  
DADOS DE MICROARRANJOS DO GENOMA DA BACTÉRIA  
MARINHA *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EM PRESENÇA DE  
N-ACETILGLICOSAMINA.**

Antônio Alves dos Santos Neto

Março , 2010

**Orientador:** Fabiano Lopes Thompson, Dr.

A análise da expressão gênica em larga escala é de fundamental importância para a melhor compreensão do funcionamento celular e dos mecanismos de regulação gênica. Ela possibilita a medida dos níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente, o que torna possível uma visão mais abrangente do sistema biológico. Dentre as principais técnicas experimentais disponíveis para esta finalidade, a tecnologia de microarranjo tem sido amplamente utilizada. O objetivo desta dissertação foi determinar os genes de *Vibrio parahaemolyticus* que têm sua expressão induzida ou reprimida na presença do aminoaçúcar N-acetilglucosamina (NAG). *V. parahaemolyticus* é uma bactéria marinha, comumente encontrada na água e em associação com organismos marinhos. O NAG é um dos aminoaçúcares mais abundantes no meio marinho. Para isso, *Vibro parahaemolyticus* RIMD2210633, foi cultivada em dois meios como fontes de energia. O primeiro meio composto por maltose e NAG (controle) e o segundo apenas por NAG (tratamento). O cultivo bacteriano foi feito em condições aeróbicas, sob baixa agitação, a 28°C. Foram retiradas duas amostras do cultivo no tempo de 24 horas após o início do experimento a fim de realizar a extração de mRNA e a preparação do cDNA. Os experimentos foram feitos em três replicas. As misturas de cDNA



preparadas a partir do RNA extraído de cada réplica foram utilizadas em hibridizações em lâminas de microarranjo contendo um total de 4832 ORFS do genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633. A análise comparativa da expressão gênica de *V. parahaemolyticus* nas duas condições de cultivo resultou na detecção de 59 genes com expressão induzida, 38 genes reprimidos, e 4245 sem expressão modificada (aumentada ou diminuída) na presença de NAG. No total, 523 genes foram excluídos da comparação pois a hibridização não foi satisfatória. Ocorreu uma ordenação dos genes seguindo a classificação funcional do banco de dados TIGR-CMR e KEGG. Os genes com expressão induzida, pertencem principalmente às classes de funções regulatórias, metabolismo de energia, e proteínas de transporte. Foram também encontradas proteínas PilA e de quimiotaxia, sugerindo um papel da NAG na transformação. Já os genes de expressão reprimida compreendem principalmente as funções de metabolismo de energia, endereçamento celular, e proteínas hipotéticas. O presente estudo demonstrou que NAG interfere na regulação de diferentes processos celulares, incluindo a capacidade de captura de DNA do meio por *V. parahaemolyticus*.

Abstract of Dissertation presented to LNCC/MCT as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Sciences (M.Sc.)

**COMPUTATIONAL BIOLOGY APPLIED TO MICROARRAY  
DATA ANALYSIS FROM GENOME OF MARINE BACTERIUM  
*VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN PRESENCE OF  
N-ACETYLGLUCOSAMINE**

Antônio Alves dos Santos Neto

March, 2010

**Advisor:** Fabiano Lopes Thompson, Dr.

Large scale gene expression analysis has fundamental importance for understanding cellular function and gene regulation mechanics. It enables the measurement of expression levels of thousands of genes simultaneously, and makes possible a wider understanding of the biological system. Among the main experimental techniques available for this purpose, microarray technology has been widely used. The objective of this work was to determine the genes of *Vibrio parahaemolyticus* which have their expression induced or repressed in presence of amino-sugars N-acetylglucosamine (NAG). *V. parahaemolyticus* is a marine bacterium, commonly found in water and in association with marine organisms. NAG is one of the most abundant amino sugars in the marine environment. For this, **V. parahaemolyticus** RIMD2210633, was cultivated in two media as sources of energy. The first medium consists of maltose and NAG (control) and the second only by NAG (treatment). Bacterial culture was done under aerobic conditions and low agitation at 28°C. Two samples were drawn from the medium 24 hours after the experiment beginning in order to perform the extraction of mRNA and preparation of cDNA. Three replicas of the experiments were made. Mixtures of cDNA prepared from RNA extracted from each replicate were used in hybridizations in microarray

slides containing a total of 4832 ORFs from the *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 genome. Comparative analysis of gene expression of *V. parahaemolyticus* in two culture conditions resulted in detection of 59 genes with expression induced, 38 repressed genes, and 4245 without modified expression (increased or decreased) in presence of NAG. In total, 523 genes were excluded from this comparison because the hybridization was unsatisfactory. There was a gene ordination following the functional classification of the database TIGR-CMR and KEGG. The genes with induced expression mainly belong to classes of regulatory functions, energy metabolism, and transport proteins. PilA and Chemotaxis proteins were found, suggesting a role of NAG in the transformation. Repressed expression genes are mainly included in the functions of energy metabolism, cell address, and hypothetical proteins. This study demonstrated that NAG interfere in regulation of different cell processes, including the ability to capture DNA from the medium by *V. parahaemolyticus*.

# Sumário

<b>1</b>	Introdução	1
1.1	Distribuição e abundância de vibrios . . . . .	1
1.1.1	Interação de vibrios com organismos de importância econômica	
	3	
1.1.2	Simbiontes . . . . .	4
1.2	<i>V. parahaemolyticus</i> . . . . .	4
1.3	Genômica de vibrios . . . . .	8
1.4	Utilização de N-acetilglicosamina por vibrios . . . . .	9
1.5	Pós-genômica e a análise da expressão gênica por meio de microar- ranjos . . . . .	12
1.6	Análise de Microarranjos (Microarrays) . . . . .	13
1.7	MATLAB . . . . .	15
<b>2</b>	Objetivos	16
2.1	Objetivo Geral . . . . .	16
2.1.1	Objetivos específicos . . . . .	16
<b>3</b>	Materiais e Métodos	17
3.1	Experimentos de cultivo de <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD2210633 . .	17
3.2	Extração dos ácidos nucleicos e preparação do cDNA . . . . .	18
3.3	Purificação do RNA total . . . . .	19
3.4	Preparação do cDNA total marcado . . . . .	20

3.5	Detalhes sobre a lâmina de microarranjo . . . . .	21
3.5.1	Detalhes sobre a lâmina de microarranjo de <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD2210633 . . . . .	21
3.6	Bioinformática e análise numérica dos dados . . . . .	23
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>26</b>
4.1	Curva de crescimento de <i>V. parahaemolyticus</i> . . . . .	26
4.2	Extração do RNA de <i>V. parahaemolyticus</i> . . . . .	27
4.2.1	Qualidade do RNA . . . . .	28
4.3	Análise do resultado de hibridização das lâminas de microarranjo . . . . .	29
4.4	Categorias funcionais de genes com expressão induzida ou reprimida na presença de N-acetilglicosamina . . . . .	31
4.5	Genes induzidos pela N-acetilglicosamina após 24 horas de cultivo . . . . .	31
4.6	Genes reprimidos pela N-acetilglicosamina após 24 horas . . . . .	36
4.7	Dendogramas . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>42</b>
5.1	Curva de crescimento . . . . .	42
5.2	Análise de transcriptomas . . . . .	43
5.3	Genes induzidos pela N-acetilglicosamina . . . . .	45
5.4	Genes reprimidos pela N-acetilglicosamina . . . . .	50
5.5	Importância da N-acetilglicosamina para o crescimento do <i>V. parahaemolyticus</i> . . . . .	54
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>56</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>57</b>
<b>7</b>		<b>76</b>
7.1	Script MATLAB . . . . .	76

# Lista de Figuras

## Figura

1.1	Vibrio parahaemolyticus . . . . .	5
1.2	Representação circular do genoma completo . . . . .	9
1.3	Exemplo de um experimento de microarranjo . . . . .	14
3.1	Esquema dos spots da lamina de Microarranjo . . . . .	22
4.1	Curva de crescimento . . . . .	27
4.2	Gel de agarose . . . . .	29
4.3	Laminas do experimento do microarranjo . . . . .	30
4.4	Classificação funcional de genes . . . . .	32
4.5	Dendograma dos genes induzidos . . . . .	40
4.6	Dendograma dos genes reprimidos . . . . .	41
5.1	Operon <i>nag</i> . . . . .	46
5.2	Ciclo de Krebs . . . . .	52
7.1	Script do MATLAB . . . . .	76

# Lista de Tabelas

## Tabela

4.1	Genes Induzidos . . . . .	33
4.2	Genes Reprimidos . . . . .	37

# Capítulo 1

## Introdução

O estudo da biologia de vibrios iniciou há aproximadamente 150 anos, quando Filippo Pacini tentava descobrir o agente etiológico da cólera, o *Vibrio cholerae*, que matava centenas de milhares de pessoas na Europa e no resto do mundo (Howard-Jones, 1984; Bentivoglio e Pacini, 1995). Aproximadamente 40 anos depois, Martinus Beijerinck confirmou a presença de vibrios no ambiente marinho e também descreveu as primeiras espécies associadas com organismos neste ambiente: *Photobacterium phosphoreum*, *V. fischeri* e *V. splendidus* (Emmeluth; Mader, 2004). Além do aspecto importante de patogenicidade para humanos, vibrios são amplamente distribuídos em diversos habitats e abundantes no ambiente marinho. Algumas espécies são patógenos importantes de animais, causando doenças em recifes de corais, peixes, camarões e moluscos, enquanto que outras estabelecem relação mutualística com diversos animais marinhos e têm papel importante como componentes do plâncton e da cadeia alimentar microbiana.

### 1.1 Distribuição e abundância de vibrios

Vibrios são cosmopolitas e abundantes no ambiente aquático, incluindo águas oceânicas costeiras e profundas, estuários, fiordes, lagos antárticos, rios e sedimentos (Farmer, 1992), podendo atingir abundâncias na ordem de  $10^8$  células por litro de água, como detectados na baía de Chesapeake (EUA) com o auxílio da técnica de *fluorescent in situ hybridization* (FISH) (Heidelberg et al., 2002b). A abundância



de vibrios planctônicos pode ser muita baixa durante alguns períodos do ano, devido à intensa predação por protozoários flagelados (Beardsley et al., 2003), ou pelo estabelecimento de um estágio conhecido como “viável-mas-não-cultivável” (*viable but non culturable*, VBNC)(Colwell e Grimes, 2000). Os vibrios também ocorrem em abundância na superfície e no interior de organismos aquáticos. O número de células de vibrios sobre um único copépodo pode chegar a mais de  $10^6$  (Heidelberg et al., 2002a) e em lofóforos de sépias este valor chega a  $10^{11}$  (Nishiguchi, 2000). A elevada densidade de vibrios também é detectada no trato digestivo de peixes ( $10^6 CFU/g$  de tecido), moluscos ( $> 10^5 CFU/g$  de tecido) (Pujalte et al., 1999; Sawabe et al., 2003), e camarões ( $10^4 - 10^9 CFU/g$  de tecido) (Gomez-Gil et al., 1998; Oxley et al., 2002).

*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* são perigosos patógenos para o homem. Atualmente, sugere-se que muitos vibrios se tornaram patogênicos após infecção por bacteriófagos (Faruque et al., 1998; Heidelberg et al., 2000; Nishibuchi e Kaper, 1995). Estes bacteriófagos, que podem ser abundantes no ambiente marinho ( $> 10^6/mL$ ), podem carregar nos seus genomas genes de virulência essenciais para o processo de infecção humana, tal como a toxina da cólera (CT).

Os copédodos e outros animais quitinosos estão entre os principais reservatórios de vibrios, incluindo linhagens patogênicas ou não. Vibrios patogênicos podem ser transmitidos para o homem por duas vias principais: água e/ou alimentos contaminados. Halpern et al. (2003) sugeriram que insetos quironomídeos também podem funcionar como vetores de vibrios, especialmente de *V. cholerae*.

*V. cholerae* sorotipos O1 e O139 são responsáveis por pandemias de cólera, mas *V. cholerae* não-O1/não-O139 também podem estar envolvidos em casos esporádicos de cólera (Thompson et al., 2003b). *V. cholerae* matou, nos últimos três anos, mais de 10 mil pessoas, principalmente em países do terceiro mundo, de acordo com estatísticas da Organização Mundial da Saúde (www.who.org). No Brasil, os últimos casos fatais ( $n = 17$ ) ocorreram em 2000. Nos EUA, o Centro

para Controle de Doenças (CDC; <http://www.cdc.gov>) documentou 296 casos de infecção por vibrios em 2000, dos quais 22 foram fatais, e provavelmente devido a *V. vulnificus*. Esta bactéria causa infecção de feridas e septicemia. Conforme o CDC, a infecção provavelmente ocorreu devido ao consumo de frutos do mar contaminados, tais como ostras, camarões e peixes. Este é também um dos principais motivos das gastroenterites causadas por *V. parahaemolyticus*, muito comuns no Japão.

Outras espécies de vibrios, incluindo *Grimontia hollisae*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus*, podem, esporadicamente, causar infecções no homem (Farmer, 1992).

### **1.1.1 Interação de vibrios com organismos de importância econômica**

A aquicultura no Brasil tem crescido consideravelmente nos últimos anos. De acordo com estatísticas da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC; <http://www.abccam.com.br/>), a produção de camarões (*Litopenaeus vannamei*) chegou a 60 mil toneladas em 2008, oriundas principalmente dos estados do Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Esta produção resultou na geração de pelo menos 150 milhões de dólares para estes estados. Já o relatório de 2008 do Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Sul e Sudeste (CEPSUL; [http : //www.ibama.gov.br/projetos\\_entros centros/cepsul/cepsul.htm](http://www.ibama.gov.br/projetos_entros centros/cepsul/cepsul.htm)) aponta que a criação de mexilhões (*Perna perna*) gerou, no exemplo citado de Santa Catarina, 5.000 empregos diretos e 6 milhões de dólares em divisas no ano.

Um dos principais problemas que prejudica a produção e o avanço da aquicultura no Brasil são as doenças bacterianas. Vibrios são um dos grupos predominantes em criações de peixes, camarões e moluscos devido à alta concentração de nutrientes dissolvidos na água e de antibióticos presentes nestes ambientes. Vibrios são um dos principais patógenos de peixes, camarões e moluscos (Austin e Austin,

1999; Lightner e Redman, 1998). Alguns exemplos são: *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. penaeicida*, que causam doença em camarões (Ishimaru et al., 1995; Lavilla-Pitogo et al., 1998), enquanto que *V. anguillarum* e *V. salmonicida* causam doença em peixes (Austin e Austin, 1999). Recentemente, foram descobertas novas espécies de vibrios associadas com mortalidade massiva de larvas de bivalves (*Nodipecten nodosus*) em Florianópolis (Ben-Haim et al., 2003) (Thompson et al., 2003a). Atualmente, o estudo da biodiversidade de vibrios ajuda a desenvolver melhores sistemas de detecção e controle destes patógenos em ambientes de criação intensiva.

### 1.1.2 Simbiontes

Muitos vibrios estabelecem relações mutualísticas com organismos aquáticos (Nyholm et al., 2009). *V. fischeri*, conhecido produtor de bioluminescência, e *V. haliotocoli*, degradador de alginato (Sawabe et al., 1995), estabelecem relações mutualísticas com sépias e abalones, respectivamente. De acordo com McFall-Nagai (1999), estas bactérias co-evoluíram com seus hospedeiros e influenciaram o desenvolvimento destes animais. Examinando linhagens de *V. haliotocoli* isoladas do estômago de diferentes espécies de abalones, Sawabe et al. (2002) detectaram genótipos bacterianos específicos para cada espécie de gastrópode, evidenciando que a co-especiação ocorreu nestas espécies. *V. parahaemolyticus* é frequentemente associado a moluscos de diferentes espécies (Rodriguez e Hofer, 1986).

## 1.2 *V. parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* 1.1 é um bacilo Gram-negativo, halofílico, reto ou ligeiramente curvo, pleomórfico, móvel, anaeróbio facultativo, não esporulante, medindo 1 a 3  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,4 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Sakazaki et al., 1968). Ele possui um flagelo polar simples, se cultivado em meio líquido, e numerosos flagelos laterais (peritríqueos) quando cultivado em meio sólido (Kaneko e Colwell, 1975). As colônias formadas em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS)

apresentam de 2 a 5 mm de diâmetro após 18-24 horas de incubação a 37 °C, sendo circulares, convexas e lisas, com coloração azul-esverdeada (Komada, 1968). O *V. parahaemolyticus* é capaz de crescer na presença de 2 a 8 % de cloreto de sódio (NaCl), não crescendo na ausência de NaCl ou em concentração superior a 10% (Sakazaki et al., 1968). Bactérias desta espécie são facilmente identificadas por meio de ferramentas moleculares, tais como Rep-PCR, AFLP e MLST (Thompson et al., 2008).



Figura 1.1: *Vibrio parahaemolyticus* (<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/enterobact.htm>).

O *V. parahaemolyticus* é um dos principais causadores de gastroenterite aguda no homem, que se caracteriza por quadros que variam de uma diarreia aquosa até, ocasionalmente a diarreia com sangue, principalmente, após o consumo de pescado ou frutos do mar in natura. O primeiro relato da doença causada pelo *V. parahaemolyticus* ocorreu no ano de 1950 na cidade de Osaka no Japão, quando Fujino et al. (1953) isolaram essa bactéria de um alimento chamado shi-

rasu, prato da culinária japonesa preparado à base de sardinha. Neste episódio, o consumo de shirasu seria responsável por 272 casos de gastroenterite e 20 óbitos. Mais tarde, essa doença foi chamada de "Diarréia de Verão Japonesa", pois 50% dos casos de diarréia causados por esse microrganismo, na década de 60, ocorreram na estação de verão superando o número total dos casos de salmonelose e shigelose no país (Komada, 1968). O primeiro surto de gastroenterite causado por *V. parahaemolyticus* nos EUA aconteceu em 1971 e resultou em 425 doentes devido ao consumo de caranguejos cozidos no vapor e salada de caranguejos (Molenda et al., 1972). O *V. parahaemolyticus* é frequentemente encontrado em regiões tropicais e subtropicais tendo sido relatados casos de infecção na Grã-Bretanha, Espanha, México, Togo, Taiwan, Golfo Pérsico e Chile (Monsreal e Abuxapqui, 1988; Harth et al., 2009).

O primeiro relato de gastroenterite causada por *V. parahaemolyticus* no Brasil ocorreu em 1983 (Hofer, 1983). Subsequentemente, diversos estudos evidenciaram a presença desta bactéria na água e em animais marinhos (Magalhães et al., 1991). Estudos recentes mostraram que esta bactéria está amplamente disseminada na costa brasileira, podendo estar associada a corais, cnidários e moluscos (Chimetto et al., 2008b,a). Uma parcela significativa destas bactérias contém os genes de virulência essenciais no processo de gastroenterite.

A patogenicidade do *V. parahaemolyticus* está relacionada à capacidade de produzir enzimas hemolíticas citotóxicas, denominadas hemolisina termoestável direta (Tdh) e hemolisina termoestável relacionada com Tdh (Trh)(Honda et al., 1988), e urease (Suthienkul et al., 1995). Nem todos os *V. parahaemolyticus* produzem essas toxinas. A hemolisina termoestável direta (Tdh), considerada o principal fator de virulência de *V. parahaemolyticus*, é uma enterotoxina citotóxica que atua dentro e fora da célula do hospedeiro, induzindo a morte através de apoptose e necrose (Naim et al., 2001). A Tdh atua diretamente nos eritrócitos dos hospedeiros, levando à hemólise (Sakurai et al., 1973) e aumento da permeabilidade vascular (Nishibuchi et al., 1985). Esta hemolisina também induz o acúmulo de

fluido no intestino delgado de coelhos (Nishibuchi et al., 1992; Raimondi et al., 2000).

A detecção da produção de Tdh é testada pela presença de beta-hemólise em meio de cultura Wagatsuma, conhecido como fenômeno de Kanagawa (KP) ou Kanagawa-positivo (KP) (Nishibuchi e Kaper, 1995). Inicialmente, supunha-se que apenas as cepas Kanagawa-positivo eram virulentas, no entanto, atualmente são descritos casos de gastroenterite causada por cepas de *V. parahaemolyticus* Kanagawa-negativo, correspondendo a 12% dos casos totais (Hackney et al., 1980). Hondo et al. (1987) isolaram cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa-negativo, a partir de fezes de pacientes de surtos de gastroenterite na República das Maldivas. Estas cepas apresentavam uma nova atividade hemolítica (Honda et al., 1988). A nova hemolisina recebeu o nome de Trh. Desde então, o número de casos por cepas Trh-positivas têm aumentado. Aproximadamente 22% de amostras de ostras (N=34 de 156) apresentaram cepas patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus* KP positivas, produtoras de urease e possuíam o gene *trh* (DePaola et al., 2003). Aparentemente, há uma correlação entre a presença do gene *trh* e a produção de urease (Magalhães et al., 1992). Na Tailândia, 489 cepas isoladas de casos clínicos foram examinadas, dessas, 8% eram Urease-positiva. Iida et al. (1998) analisaram a distância entre o gene *ure*, responsável pela produção da urease, e o gene *trh* no cromossomo do *Vibrio parahaemolyticus* e descobriram que ambos estão localizados a poucos kilobases de distância, sugerindo que os genes *ure* e *trh* estão geneticamente interligados e que a produção de urease pode ser utilizada como diagnóstico para detecção de bactérias Trh-positivas (Kelly e Stroh, 1989). A patogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus* também depende da sua capacidade de invasão no tecido intestinal. A invasão de *V. parahaemolyticus* em células “Caco-2” (*human colon carcinoma-derived cell line*) foi estudada por Akeda et al. (1997). Foi demonstrada a invasão em menos de sete horas por células contendo Tdh. *V. parahaemolyticus* também tem a capacidade de se disseminar pelo organismo através do sistema linfático ou circulatório, causando septicemia (Boutin et al.,

1979).

Merrell et al. (1984) estudaram os efeitos patológicos do *V. parahaemolyticus* sobre células epiteliais humanas e concluíram que o *V. parahaemolyticus* sem flagelo não adere na célula de tecido normal ou degenerado. É evidente que flagelos são importantes para a locomoção, quimiotaxia e adesão à célula hospedeira (McCarter, 2001). O antígeno K presente no polissacarídeo encapsulado (capsular polysaccharide, CPS) foi suposto como auxiliador na aderência às células hospedeiras (Hsieh et al., 2003).

### 1.3 Genômica de vibrios

O estudo dos genomas de vibrios tem elucidado diversas questões sobre a biologia deste grupo de bactérias. Genomas de algumas espécies de vibrios consistem em dois cromossomos, podendo variar entre 4,1 a 5,2 Mbp. De acordo com Yamaichi et al. (1999), a presença de dois cromossomos em vibrios é uma vantagem para replicação rápida, que é normalmente observada em espécies deste grupo. A duplicação de células pode ocorrer em menos de 10 minutos em algumas espécies (Ayar et al., 2002).

O genoma de *V. cholerae* consiste de um cromossomo maior, de 2,96 Mbp, que contém 2.770 genes, e de um menor, com 1,07 Mbp, que contém 1.115 genes (Heidelberg et al., 2000). A duplicação de 105 genes envolvidos com quimiotaxia e transporte de solutos indica a importância destes genes na biologia de *V. cholerae*, incluindo sua persistência no meio ambiente entre os períodos de epidemia. Heidelberg et al. (2000) argumenta que o cromossomo menor de *V. cholerae* seria um mega plasmídeo, porque este cromossomo não tem operons de rRNA, contém menos genes funcionais e ainda contém um super-integron. Outros grupos de pesquisa sugerem, por outro lado, que o cromossomo menor teria sido parte de um único cromossomo ancestral (Tagomori et al., 2002).

O genoma de *V. parahaemolyticus* consiste em um cromossomo maior, de 2,96 Mbp, que contém 2.770 genes, e um menor, com 1,07 Mbp, que contém 1.115

genes (Makino et al., 2003) 1.2. A região do integron ocorre no cromossomo maior e há genes de rRNA que estão presentes no cromossomo menor. Existem claras diferenças na ordem física de homólogos entre os genomas de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* provavelmente devido à recombinação intracromossômica e a reorganização genômica. No genoma de *V. parahaemolyticus* foram encontrados apenas genes integrantes do mecanismo de secreção do Tipo III (Akeda et al., 2009).

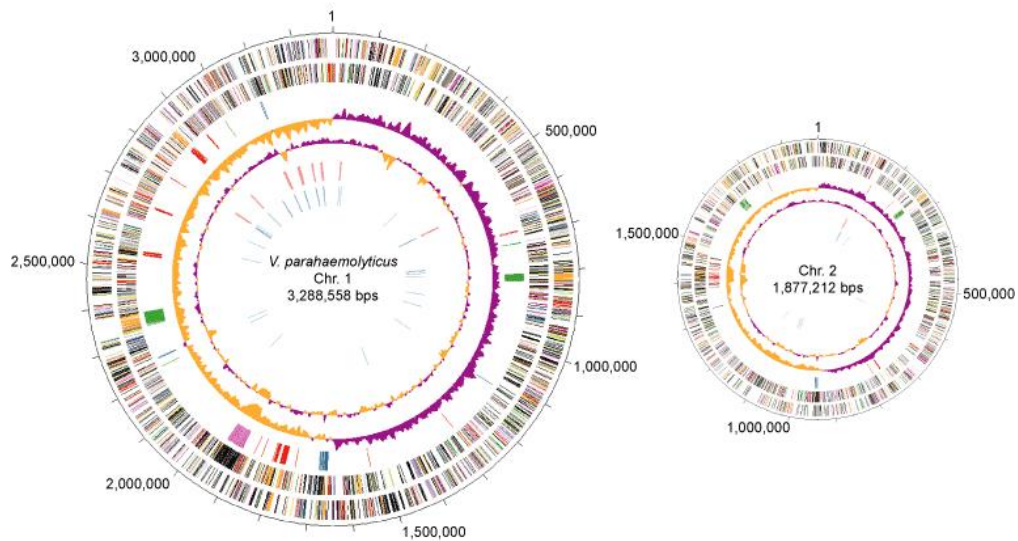


Figura 1.2: Representação circular do genoma completo de *V. parahaemolyticus* (Makino et al., 2003).

#### 1.4 Utilização de N-acetilglicosamina por vibrios

A N-acetilglicosamina ou N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) é um amino açúcar monômero da quitina que, por sua vez, é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, podendo estar presente, principalmente, no envelope celular de fungos e no exoesqueleto de invertebrados (Muzzarelli, 1977). GlcNAc também pode ser encontrado como componente de diversos outros polissacarídeos no ambiente aquático. Estima-se que os copépodos produzam bilhões de toneladas de quitina por ano. Esta grande quantidade de polissacarídeo insolúvel no ambiente é reciclada, principalmente por bactérias quitinolíticas, incluindo membros da família



*Vibrionaceae*. A interação destas bactérias a partículas quitinosas é um processo chave para a reciclagem de nutrientes e manutenção do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (Carman e Dobbs, 1997). Muitas espécies do gênero *Vibrio* que vivem no ambiente aquático, inclusive *V. parahaemolyticus*, são capazes de utilizar a quitina como fonte de carbono, nitrogênio e energia, através da secreção de quitinases e proteínas que ligam a quitina (Colwell, 1970; Nalin et al., 1979; Garay et al., 1985; Colwell, 1996; Connell et al., 1998; Keyhani e Roseman, 1999; Svitil et al., 1997; Meibom et al., 2004).

N-acetil-D-glucosamina é um aminoaçúcar abundante no ambiente, sendo um componente da parede celular e dos lipopolissacarídeos de bactérias (Dobrogosz, 1968; Holmes e Russell, 1972; Rolls e Shuster, 1972). Pode ser utilizado como fonte de carbono por bactérias levando a taxas de crescimento populacional tão elevadas quanto as obtidas utilizando-se glicose (White, 1968; Bernhein e Dobrogosz, 1970). A presença de GlcNAc induz a expressão de quitinases de vibrios, o que leva a um aumento da aderência a superfícies. Durante a hidrólise da quitina, a produção e aumento de concentração de GlcNAc atrai mais células de *Vibrio* por quimiotaxia (Bassler et al., 1991a; Bhowmick et al., 2007).

A assimilação e metabolismo de N-acetil-D-glucosamina são promovidos pelos produtos de gens *nag*, que formam um regulon *nagE nagBACD*, em *E. coli* (Plumbridge, 1989; Rogers et al., 1988; Vogler e Lengeler, 1989). Linhagens O1 e não O1 de *V. cholerae* estudadas revelaram a presença do gen *nagB*, no cromossomo II, e os demais gens, em uma organização *nagE nagAC*, no cromossomo maior (Heidelberg et al., 2000; Yamano et al., 1997). Algumas linhagens ainda apresentam outra ORF similar ao gen *nagA*, dentro da ilha de patogenicidade VPI-2, denominado *nagA-2* (Jermyn e Boyd, 2002).

O transporte de GlcNAc através da membrana interna é mediado pela enzima II<sub>nag</sub> do sistema de transporte PTS específico para GlcNAc, codificada pelo gen *nagE*, resultando em GlcNAc-6-P e piruvato. GlcNAc-6-P é processado por no mínimo seis enzimas citoplasmáticas em frutose-6-P, NH<sub>3</sub> e acetato. Dentro da

bactéria, GlcNAc-6-P sofre a ação de N-acetil-D-glucosamina deacetilase, enzima codificada pelo gen *nagA*, produzindo glicosamina-6-P (GlcN-6-P). Esta reação ocorre também de maneira inversa, sendo catalisada por glicosamina-6-P acetilase. GlcN-6-P pode ser utilizada como substrato pela enzima NagB, glicosamina-6-P deaminase (isomerase), gerando como produto frutose-6-P ou ser utilizada na via de biossíntese do envelope celular. Frutose-6-P será utilizada na glicólise para a obtenção de energia pela bactéria ou será processada por glicosamina-6-P sintase, em uma reação inversa à de NagB, gerando GlcN-6-P novamente (Yu et al., 1991; Bassler et al., 1991b; Bouma e Roseman, 1996; Chitlaru e Roseman, 1996; Keyhani e Roseman, 1996, 1999; Park et al., 2000).

Em diversas espécies de vibrio, GlcNAc é capaz de induzir e reprimir a expressão de diferentes conjuntos de genes. Em *V. parahaemolyticus*, o presente trabalho é pioneiro no estudo da expressão gênica em resposta à interação e utilização de GlcNAc.

A expressão dos genes *nag* de *E. coli* é induzida quando a bactéria é cultivada na presença de GlcNAc ou glicosamina e é regulada pelo complexo cAMP-CRP (Plumbridge, 1990). NagC é o repressor dos genes *nagE nagBA*, sendo identificados, na região intergênica entre *nagB* e *nagE*, dois sítios de ligação do repressor e, no meio deles, um sítio de ligação de cAMP-CRP. Os sítios de ligação de NagC, denominados Caixa E e Caixa B, são orientados para controlar a expressão dos promotores de *nagE* e *nagB*, respectivamente (Plumbridge e Kolb, 1991). Na ausência de fontes de aminoácidos, NagC reprime a expressão do operon *nag* e ativa a expressão do operon *glmUS*, que codifica genes envolvidos na formação de GlcNAc-6-P e UDP-GlcNAc dentro da célula (Plumbridge e Kolb, 1993; Plumbridge, 1995).

Em *V. cholerae* não O1 e O1 (especificamente El Tor), os dois sítios de ligação a NagC e o sítio CAP foram encontrados na região intergênica entre *nagE* e *nagAC* e apenas o sítio NagC foi detectado entre os genes *nagB* e uma ORF adjacente a montante (Yamano et al., 1997; Soares, 2000). Regiões promotoras dos genes *nagB* e *nagE* de *V. cholerae* El Tor foram caracterizadas e estudos mostraram que o gen

*nagB* de *V. cholerae* El Tor é induzido por GlcNAc sozinha ou em combinação com glicerol ou D-glucose, mas não é induzido por glicerol, D-glucosamina ou D-glucose. Além disso, o promotor de *nagB* não sofre repressão catabólica por D-glucose e é ativado, mesmo em condições em que a utilização de GlcNAc não é essencial para *V. cholerae* (Soares, 2000; Santos, 2005).

Foram identificados, através de análises de transcriptoma de *V. cholerae*, grupos de genes envolvidos na utilização de GlcNAc e outros oligossacarídeos de GlcNAc, em comparação com genes expressos pela bactéria planctônica em água do mar. Em resposta a GlcNAc, foram identificados 22 genes com expressão ativada e 51 genes com expressão reprimida. Entre os genes ativados estão o sistema de transporte PTS, o operon *nagE*, *nagB* e *nagA-1*, a quitinase VCA0811 do cromossomo II, uma proteína de quimiotaxia (VC0449) e outros. Entre os genes reprimidos estão os que formam a succinil-CoA sintase, componentes da 2-oxoglutarato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxinase, transportador da família NadC, proteína de ligação à D-glucose integrante do transportador ABC, gliceraldeído-3-P desidrogenase, entre outros (Meibom et al., 2004).

### **1.5 Pós-genômica e a análise da expressão gênica por meio de microarranjos**

A expressão gênica é uma etapa crucial para a vida bacteriana, representando o ponto a partir do qual ocorre a produção de transcritos e seus produtos que atuarão no funcionamento celular. O controle da expressão gênica em bactérias ocorre principalmente no nível transcricional, através da indução ou da repressão da transcrição (Zaha et al., 2003).

A partir deste processo de indução/repressão as células regulam o metabolismo frente a mudanças nas condições ambientais (tais como variação nos tipos e na concentração de nutrientes no ambiente, temperatura, salinidade, e presença de hospedeiro). A regulação gênica dá à célula bacteriana controle sobre a estrutura e função, e é a base para a diferenciação celular, morfogênese e para a versatilidade

e adaptabilidade. Uma forma de estudar o controle da expressão gênica é realizar experimentos sob condições controladas de estudo onde se determina o efeito de um determinado composto, como é o caso do estudo dos efeitos da N-acetil-D-glucosamina na expressão gênica de *V. parahaemolyticus*.

## **1.6 Análise de Microarranjos (Microarrays)**

A análise de microarranjos permite o estudo da expressão gênica, através do uso de chips de DNA (DNA-Chip ou microarranjo) contendo o conjunto de genes presentes no genoma estudado. DNA-Chip são lâminas para microscopia, normalmente feitas de vidro, revestidas com compostos que conferem carga positiva, nas quais segmentos de fita-única de DNA ou cDNA são fixados e imobilizados de forma ordenada e em áreas pré-determinadas (spots). Na lâmina, cada spot possui milhões de cópias de um determinado gene transcrito (Cheung et al., 1999). Em um chip, pode-se encontrar representações de praticamente todos os genes do genoma de uma série de organismos até mesmo de humanos.

A tecnologia de microarranjo pode ser empregada no estudo de genômica funcional ou na determinação de perfis de expressão gênica (Lockhart et al., 1996; Sharp et al., 2006). Nesse tipo de estudo, utiliza-se como sonda moléculas de mRNA transcritas por uma determinada célula sob uma condição de cultivo específica (transcriptoma). Através da comparação de diferentes conjuntos de mRNA, expressos em diferentes condições ou por células distintas, procura-se reconhecer a alteração na expressão de determinados genes em respostas à presença de uma patologia ou alguma outra condição experimental, à qual a amostra em estudo foi submetida (Cheung et al., 1999). O princípio da técnica fundamenta-se na propriedade de hibridização por complementaridade entre as sondas e os fragmentos presentes no arranjo (Dalma-Weiszhausz et al., 2006; Cheung et al., 1999).

Mais especificamente, o procedimento envolve a conversão do RNA total obtido a partir da célula de interesse em cDNA, por meio de uma reação *in vitro* com o uso da enzima transcriptase reversa, na presença de nucleotídeos marcados

com fluoróforos. As moléculas de cDNA marcadas são desnaturadas e hibridizadas às moléculas de DNA presentes na lâmina de microarray. Se as seqüências forem complementares, haverá hibridização. Nos spots onde houve hibridização ocorrerá a emissão de fluorescência, que será detectada, analisada e quantificada em cada ponto. O sinal gerado representa a presença do transcrito específico para o gene correspondente ao spot. A quantificação do sinal permite que a expressão de milhares de genes seja comparada entre diferentes condições experimentais (Lockhart et al., 1996; Cheung et al., 1999).

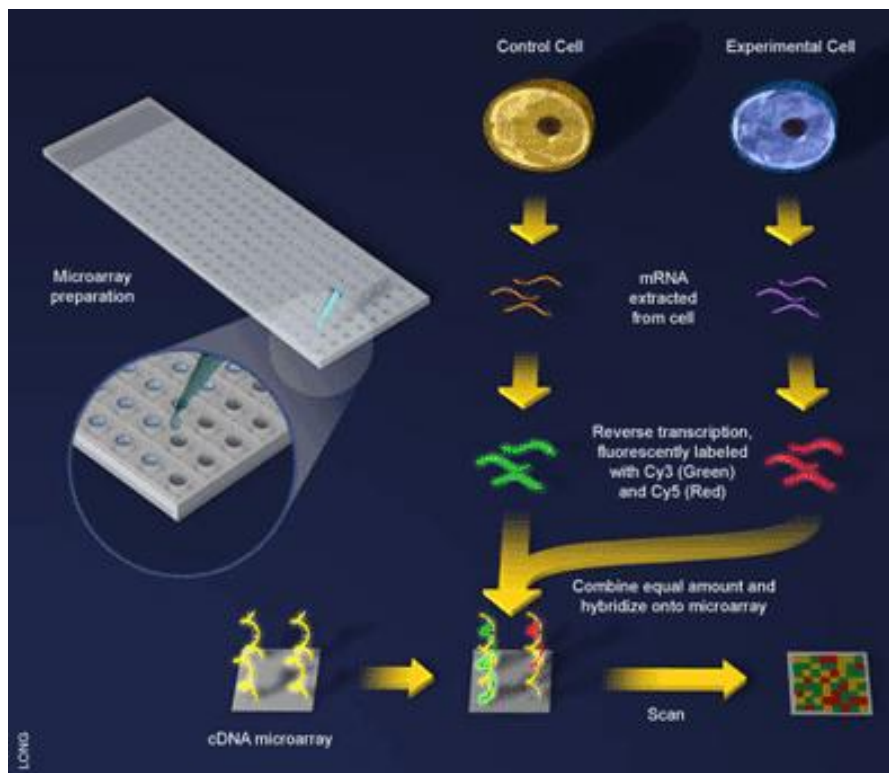


Figura 1.3: Exemplo de um experimento de microarranjo onde o RNA é extraído a partir de duas amostras diferentes e convertido em DNA complementar (cDNA), durante o qual o DNA é marcado com compostos fluorescentes. As duas amostras são misturadas para comparação e hibridizadas contra o conjunto de cDNA do microarranjo. As diferenças na expressão gênica são detectadas pelos diferentes padrões de fluorescência sobre a matriz. Retirada de <http://www.scq.ubc.ca/spot-your-genes-an-overview-of-the-microarray/>

Meibom et al. (2004), utilizam a tecnologia do microarranjo para a análise de genes de *V. cholerae* que foram expressos na presença de quitina. Foi um experimento parecido com que realizamos neste trabalho. Uma outra publicação

que utiliza o microarranjo para a análise da expressão gênica que podemos citar é a de Wang e Zhang (2001) que foi um dos primeiros artigos publicados sobre a utilização da tecnologia para estudo de Vibrios.

## 1.7 MATLAB

Vários meios industriais e acadêmicos utilizam o MATLAB por ser um software interativo direcionado à cálculos numéricos. O MATLAB permite a realização de aplicações em nível de análise numérica, análise de dados, cálculo matricial, processamento de sinais e construção de gráficos, entre outras, abordando com ampla abrangência em problemas científicos (Gaspar e Santo, 2002).

O MATLAB é um sistema interativo cujo elemento básico de informação é uma matriz que não requer dimensionamento, Este sistema permite a resolução de problemas numéricos em apenas uma fração do tempo que se gastaria para escrever um programa semelhante em uma linguagem de programação clássica (Gaspar e Santo, 2002; MathWorks, 2009a).

Existem para o MATLAB conjuntos de soluções complementares para problemas específicos que são chamados toolboxes. O toolbox de Bioinformática oferece um ambiente integrado ao MATLAB para análise do genoma e proteoma. Em especial o toolbox permite o acesso a formatos de dados genômicos e proteômicos, técnicas de análises e visualizações de sequência genômica e proteômica e análise de microarranjo (MathWorks, 2009b).

# Capítulo 2

## Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão gênica de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 cultivada na presença de N-acetilglicosamina (GlcNAc) através da técnica de microarranjo de DNA e por ferramentas da biologia computacional.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Utilizar métodos da bioinformática para auxiliar na análise de dados.
- Identificar e analisar os genes induzidos na presença de N-acetilglicosamina.
- Identificar e analisar os genes reprimidos na presença de N-acetilglicosamina.
- Identificar quais funções ou processos metabólicos de *V. parahaemolyticus* que são induzidos ou reprimidos em resposta à presença de NAG no cultivo.

# Capítulo 3

## Materiais e Métodos

A tecnologia de microarranjos foi empregada a fim de determinar quais os genes da linhagem *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 tem sua transcrição aumentada ou diminuída em resposta a presença de N-acetilglicosamina no cultivo. O microarranjo de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 foi construído pelo grupo do Professor Tetsuya Iida da Universidade de Osaka (Japão) (Izutsu et al., 2008). A linhagem *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 foi originalmente isolada de um paciente com diarreia no setor de quarentena do aeroporto de Osaka em 1996. Esta linhagem tem o gene *tdh* e é do sorogrupo O3:K6. Esta linhagem é detectada em casos clínicos e no meio marinho. A linhagem RIMD2210633 foi cultivada em meio mínimo M9 (Difco) suplementado com 0.5% de Maltose (10,2 g de meio M9, 30 g de NaCl, 0,12 g de MgSO<sub>4</sub>, 5 g de Maltose em um litro de água destilada) como fonte de carbono e 3% de NaCl a 28°C por 8 horas antes do início dos experimentos. Todo o processo do cultivo e da preparação dos ácidos nucleicos para o experimento de microarranjo foi realizada pelo Dr. Fabiano L. Thompson na Universidade de Osaka (Japão).

### 3.1 Experimentos de cultivo de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633

O experimento compreendeu dois tratamentos (1. Maltose e 2. Maltose + GlcNAc) cada um com 3 replicatas. Um inóculo de cultura bacteriana de 5 mL



foi adicionado em um Erlenmeyer contendo 500 mL de meio mínimo M9 suplementado com 0.5% de Maltose ou com 0.5% de Maltose + 0.5% de NAG. O cultivo bacteriano foi feito em condições aeróbicas, sob baixa agitação, à 28°C. Coletas de alíquotas de 50 mL de culturas foram feitas 7, 24, 44, e 72 horas após o início do experimento a fim de realizar a extração de mRNA e a preparação do cDNA. Estas alíquotas eram colocadas no gelo imediatamente e após o resfriamento elas foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspensionado com 5 mL de reagente TRIZOL (Invitrogen) e incubado por 1 hora a 4° C. Subseqüentemente, as amostras foram estocadas no ultra-freezer -80 °C. Medidas periódicas da densidade ótica (DO) foram feitas em culturas crescendo sob as mesmas condições acima com exceção de serem cultivadas em placas de 96 poços, o que permitiu a leitura da DO em um leitor de placas Victor (Perkin Elmer).

### **3.2 Extração dos ácidos nucléicos e preparação do cDNA**

A partir das alíquotas preservadas do sedimento celular com TRIZOL de cada uma das três replicatas de ambos tratamentos, as extrações de mRNA foram finalizadas. Para isto, foram inicialmente colocados 2 mL de clorofórmio em cada frasco contendo 5 mL de suspensão, e a suspensão foi agitada por meio de vortex por 15 segundos e, em seguida, incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3.500 rpm por 20 minutos a 4°C. Alíquotas de 3 mL do sobrenadante foram removidas e colocadas em um recipiente limpo. Em seguida, foram misturados 0.3 mL de  $CH_3COONa$  (3M) e 3 mL de álcool isopropílico neste recipiente, que foi incubado a 4°C por 5 minutos a fim de precipitar a mistura de ácidos nucléicos. A amostra foi centrifugada por 15 minutos a uma velocidade de 3.500 rpm a 4°C e em seguida o sobrenadante foi descartado. Na etapa final foram adicionados 2 mL de etanol (70% v/v). O etanol foi removido e o precipitado de foi seco a temperatura ambiente.

A mistura de ácidos nucléicos, contendo ambos DNA e RNA, foi tratada

com DNase I a fim de remover o DNA. A partir desta etapa é crucial garantir que todos os equipamentos e materiais estão livres de RNase. 10 $\mu$ L de Dnase I foram adicionados a 70 $\mu$ L de mistura de ácidos nucleicos (ressuspensão feita em tampão RDD). A mistura foi incubada por 1 hora a 37<sup>o</sup>C. Logo em seguida, foram adicionados 80 $\mu$ L de fenol acidífero (Invitrogen) e 80 $\mu$ L de clorofórmio e a mistura foi submetida a vortex por 5 minutos. O sobrenadante foi colocado em um recipiente limpo contendo 16 $\mu$ L de Acetato de Sódio (3 M) e 400 $\mu$ L de etanol (100% v/v), deixando em gelo por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm e a 4<sup>o</sup>C. O sobrenadante da mistura foi descartado e foram adicionados 500 $\mu$ L de EtOH (70% v/v) a fim de lavar o sedimento de RNA.

### **3.3 Purificação do RNA total**

A purificação do RNA total é feita por meio do kit RNeasy (QIAGEN). O sedimento de RNA foi ressuspensionado em 100 $\mu$ L de água livre de RNase e misturada com 350 $\mu$ L de tampão RTL (que contém 3  $\mu$ L/mL  $\beta$ -mercaptoethanol) e 250 $\mu$ L de etanol absoluto. O volume total (700 $\mu$ L) foi aplicado em uma coluna e foi submetido à centrifugação por 15 segundos a 15000 rpm. Um volume de 500 $\mu$ L do tampão de lavagem RPE foi adicionado a coluna e feita a centrifugação por 15 segundos a 15000 rpm. O RNA purificado retido na membrana de sílica-gel foi recuperado pela adição de 50 $\mu$ L de água. Subsequentemente, 10 $\mu$ L de acetato de sódio (3M) e 250 $\mu$ L de etanol absoluto foram adicionados aos 50 $\mu$ L e incubados no gelo por 5 minutos. Este material foi centrifugado por 15 minutos a 15000 rpm. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o sedimento de RNA purificado foi ressuspensionado em 25 $\mu$ L de água livre de RNase. O RNA foi quantificado por meio de espectrofotômetro (Abs 260 nm) e a integridade foi verificada por meio de eletroforese (45 minutos a 70 volts) em gel de agarose.

### 3.4 Preparação do cDNA total marcado

O RNA foi marcado por método indireto por meio de UTPs marcados com o grupo reativo aminoallyl que reage e se liga aos corantes Cy3 e Cy5. Primeiramente, são misturados 20 $\mu$ g de RNA total purificado, 2 $\mu$ L de primer randômico (Invitrogen) e 22 $\mu$ L de água livre de RNase. Esta mistura é incubada por 5 minutos a 70°C e em seguida colocada no gelo. Na etapa seguinte são adicionados 8,0 $\mu$ L de 5 tampão *first-strand*, 2,0 $\mu$ L de DDT (0,1 M), 4,0 $\mu$ L de dNTP-aminoallyldUTP e 4,0 $\mu$ L da transcriptase reversa SuperScriptIII. Esta mistura foi incubada por 3 horas à 46°C a fim de gerar uma quantidade suficiente de cDNA. 60 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O e 100 $\mu$ L de fenol-clorofórmio foram adicionados e misturados vigorosamente. Após a centrifugação desta mistura de cDNA por 5 minutos a 15000 rpm, foi removido o sobrenadante e adicionado em um recipiente contendo 10 $\mu$ L de acetato de sódio (3 M) e 250 $\mu$ L de etanol (100%). O cDNA foi incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi feita a centrifugação por 15 minutos a 15.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foram adicionados 500 $\mu$ L de etanol (70%) para remover impurezas e produtos não incorporados no cDNA. O etanol foi removido e a amostra foi seca a temperatura ambiente por 5 minutos, resultando em um sedimento de cDNA purificado.

A fim de marcar o cDNA total com os corantes fluorescentes Cy3 ou Cy5, o sedimento de cDNA foi ressuspendido 10 $\mu$ L de NaHCO<sub>3</sub> (50mM, pH9). 10 $\mu$ L de Cy5 foram adicionados na amostra de cDNA oriunda do tratamento controle (Maltose) e 10 $\mu$ L de Cy3 foram adicionados na amostra de cDNA oriunda do tratamento teste (Maltose + Nacetilglucosamina). Cada amostra foi incubada por 1 hora no escuro. O excesso de corante foi removido com o auxílio de colunas CENTRI SEP (Applied Biosystems). O material marcado foi adicionado nestas colunas e centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm. O material coletado após centrifugação foi precipitado com 2 $\mu$ L de acetato de amônia (3 M) e 100 $\mu$ L de etanol absoluto, sendo lavado com etanol 70% e seco a temperatura ambiente. O cDNA seco foi dissolvido em 20 $\mu$ L de água. A solução de hibridização foi preparada misturando-

se 20 $\mu$ L do cDNA dissolvido com 3 $\mu$ L de sódio dodecilo sulfato (10%), 6 $\mu$ L de tRNA de levedura e 15 $\mu$ L de solução SSC (20 X; 3M NaCl, 0.3M de citrato de sódio, pH7.0). Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 96<sup>o</sup>C, e logo em seguida incubada por mais 5 minutos a 60<sup>o</sup>C. Esta etapa foi feita imediatamente antes da adição da mistura na lâmina de microarranjo.

### **3.5 Detalhes sobre a lâmina de microarranjo**

As lâminas de microarranjo foram concomitantemente preparadas para receber a mistura. Primeiramente, as lâminas foram lavadas com solução de bloqueio (7,5g de anidrido succínico, 472,5ml de *1-methy-2-pyrrolidinone* e 1,0 M de borato de sódio pH8.0). Em seguida as lâminas foram lavadas com água duas vezes por 10 minutos cada lavagem. As lâminas foram lavadas com etanol absoluto e secas no hibridizador (MAUI Lid BioMicro Systems). As misturas contendo cDNA foram adicionadas nas lâminas e mantidas no hibridizador por 16 horas a 60<sup>o</sup>C. Em seguida as lâminas foram lavadas com tampão SSC três vezes consecutivas e uma vez com etanol absoluto. Após a lavagem e a secagem, as lâminas foram examinadas em um scanner ScanArray Express Lite que permite a detecção e a quantificação da fluorescência (Perkin Elmer).

#### **3.5.1 Detalhes sobre a lâmina de microarranjo de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633**

A descrição detalhada do microarranjo está disponível em Izutsu et al. (2008). Em linhas gerais, o microarranjo contém todas as 4832 ORFS do genoma de RIMD2210633. A fim de construir o microarranjo, cada ORF foi amplificada por PCR e clonada em plasmídeo pCRII-TOPO (Invitrogen) e introduzidos na *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Os transformantes foram cultivados e armazenados em caldo nutriente LB contendo 20% (p/v) de glicerol. Cada ORF do *V. parahaemolyticus* foi amplificada a partir do plasmídeo utilizando os primers M13-Forward e M13-Reverse. Os produtos de PCR apresentaram um comprimento médio de 520 pb. A

amplificação de cada ORF por PCR foi realizada usando a DNA polimera Takara ExTaq (Takara Bio Inc.) e DNA genômico da linhagem RIMD2210633 como molde. O programa de PCR compreendia uma etapa inicial de 5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido por 30 ciclos de amplificação (5 minutos a 95°C, 30 segundos a 55°C, e 2 minutos a 72°C). Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Cada produto PCR foi clonado dentro do vetor pCRII-TOPO usando um kit de clonagem TOPO TA (both from Invitrogen). Após verificação da qualidade e tamanho de cada um dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose, os produtos do PCR foram colocados em lâminas com uma camada de poly-L-lysina (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japão) usando o spotter SPBIO (Hitachi Software Engineering). O esquema detalhado do posicionamento dos genes na lâmina de microarrajó esta descrito na figura 3.1.

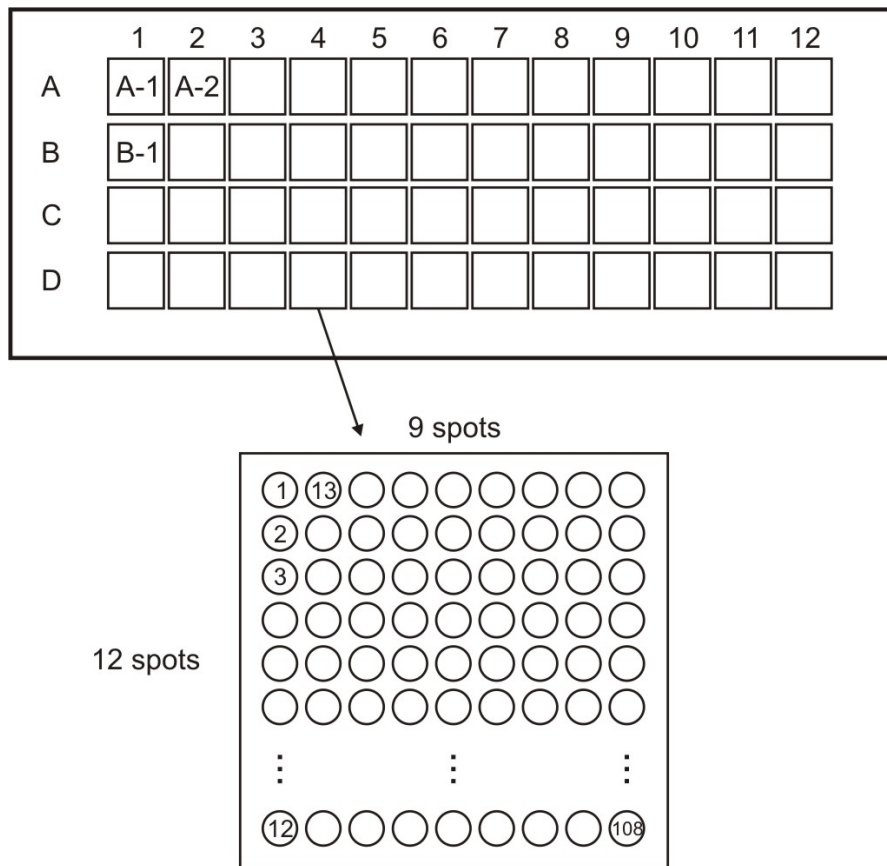


Figura 3.1: Esquema dos spots da lamina de Microarrajó. Cada spot representa uma ORF.

### 3.6 Bioinformática e análise numérica dos dados

A intensidade do sinal de cada spot foi quantificada com o software ScanArray Express, e uma análise adicional dos dados fora realizada com o software Microsoft Excel a fim de determinar a qualidade dos dados. As diferenças entre os níveis de fluorescência entre cada condição de cultivo que se apresentaram igual ou acima de dois ou igual ou menor do que menos dois foram consideradas significativas e apenas estes valores foram utilizados nas análises. Estes valores foram considerados significativos, pois refletem aumento ou diminuição do nível de expressão na ordem de quatro vezes. Foram considerados genes induzidos, aqueles que apresentaram alto nível de expressão ( $\geq 2$ ) e genes reprimidos aqueles que apresentam baixo nível de expressão ( $\leq 2$ ), em relação à condição comparada.

Foram construídos dendrogramas com o auxílio do programa Matlab a fim de detectar grupos de genes que são co-expressos ou co-reprimidos. O script executa uma leitura de uma tabela de Excel e retorna uma nova tabela com os conjuntos de duplas de nosso interesse. As tabelas geradas por este script foram utilizadas na construção de dendrogramas utilizando-se o Toolbox de Bioinformática do Matlab. O Matlab transforma as tabelas em matrizes de similaridade (com base no grau de expressão que é definido pela fluorescência) que são utilizadas para um agrupamento hierárquico. O índice de similaridade utilizado foi a Distância Euclidiana, enquanto que o algoritmo para agrupamento hierárquico foi o Método *Average Linkage*.

O método por agrupamento hierárquico define grupos a partir da matriz inicial de dados. Primeiro obtém-se uma matriz simétrica de similaridades e inicia-se a detecção de pares de casos com a mais alta similaridade; para essa combinação, segundo níveis hierárquicos de similaridade, escolhe-se entre os diversos procedimentos aglomerativos de tal modo que cada ciclo de agrupamento obedeça a uma ordem sucessiva no sentido do decréscimo de similaridade. Por exemplo, começando de uma matriz inicial de dados  $[n * p]$ , onde "n" linhas representam casos ou espécimes ou amostras e as "p" colunas as variáveis usando um coeficiente de similaridade

qualquer entre linhas, obtém-se uma matriz inicial de coeficiente de similaridade de tamanho  $[n*n]$ , que será utilizada no modo Q. Se a comparação for entre colunas, obter-se-á uma matriz inicial de coeficientes de similaridade inicial  $[p*p]$ , que será utilizada no modo R. Embora diversas medidas de similaridade tenham sido propostas, somente duas são geralmente usadas: o coeficiente de correlação de Pearson e a medida de distância Euclideana. Se as variáveis forem padronizadas a partir da matriz inicial de dados, dando o mesmo peso a cada uma delas, qualquer um desses coeficientes poderá ser diretamente transformado no outro. Na matriz inicial de coeficientes de similaridade estes representam o grau de semelhança entre pares de objetos e os mesmos deverão ser arranjados de acordo com os respectivos graus de similaridade de modo a ficarem agrupados segundo uma disposição hierárquica.

A Distância Euclidiana é uma das medidas de dissimilaridade entre pontos mais utilizadas na prática (Gauch, 1982). De acordo com Brower e Zar (1977), quanto menor o valor da Distância Euclidiana entre dois pontos, mais próximos eles se apresentam em termos de parâmetros quantitativos. A distância euclidiana entre os pontos X  $(x_1, x_2, \dots, x_i)$  e Y  $(y_1, y_2, \dots, y_i)$ , em um espaço euclidiano, é definida como:

$$\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2} \quad (3.1)$$

Segundo Carvalho et al. (2009) o método *Average Linkage*, ou ligação por média, define a distância média entre pares de objetos como sendo a relevante para elaboração da matriz de distâncias. É um método que tende a juntar clusters com baixa variância é ligeiramente tendencioso a produzir clusters com igual variância. A medida de dissimilaridade entre os clusters  $K$  e  $L$  é definida por:

$$D_{K,J} = \frac{1}{N_K N_L} \sum_{i \in C_K} \sum_{j \in C_L} d(x_i, x_j) \quad (3.2)$$

Os genes com expressão significativamente aumentada ou diminuída foram

classificados em categorias funcionais utilizando-se o Comprehensive Microbial Resource (CMR) (<http://cmr.jcvi.org>) e o KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). A posição destes genes nos cromossomos da linhagem RIMD foi determinada utilizando-se o CMR.

O Comprehensive Microbial Resource (CMR) é uma ferramenta que permite ao pesquisador o acesso de todas as seqüências do genoma bacteriano concluído até a data. Oferece acesso a ampla gama de informações e análises sobre todos os genomas procarióticos já seqüenciados. Buscas podem ser feitas por genes, genomas, regiões genômicas e propriedades dos genes. Comparações de múltiplos genomas podem ser executadas com base em diferentes critérios, tais como similaridade de seqüência e atributos dos genes (Peterson et al., 2001; CMR).

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) é uma grande plataforma que integra vários bancos de dados diferentes reunidos em três categorias principais: redes de interação molecular (vias bioquímicas) em processos biológicos, informações sobre o universo de genes e proteínas e informações sobre a vasta gama de componentes químicos e reações. A primeira contém uma coleção de mapas manualmente elaborados, representando o conhecimento atual sobre interação molecular e redes de interação. A seção dedicada às informações genômicas baseia-se em resultados pré-computados de comparação de seqüências, busca de motivos e padrões e agrupamento de genes ortólogos (Kanehisa, 1997; Kanehisa e Goto, 2000; Kanehisa et al., 2006).

Segundo Catanho et al. (2007) o CMR é um banco de dados classificado como “Genéricos e multifuncional” que tenta abranger o universo de espécies procarióticas cujos genomas foram completamente seqüenciado e oferecer os meios necessários para busca e obtenção de dados pré-computados e/ou obtidos experimentalmente para cada espécie, já o KEGG recebe a classificação de “Especializado” que se dedica à análise comparativa de características particulares associadas aos genomas e seus componentes (vias metabólicas; classificação dos genes; conservação de genes ortólogos).



# Capítulo 4

## Resultados

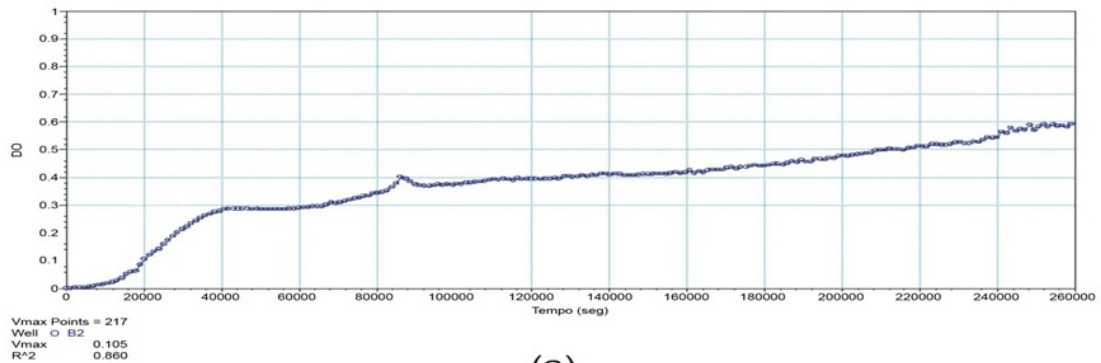
Os resultados desta dissertação apresentam o efeito da N-acetilglicosamina no crescimento, fisiologia e expressão gênica da linhagem de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633. Com a finalidade de determinar quais genes são expressos sob tais condições de cultivo, foram realizadas análises por meio de microarranjos. Estas análises permitiram a separação dos genes em duas classes claramente distintas. Uma classe composta por genes mais expressos (possivelmente induzidos) na presença de N-acetilglicosamina e uma classe contendo os genes reprimidos, em relação ao cultivo apenas com Maltose.

### 4.1 Curva de crescimento de *V. parahaemolyticus*

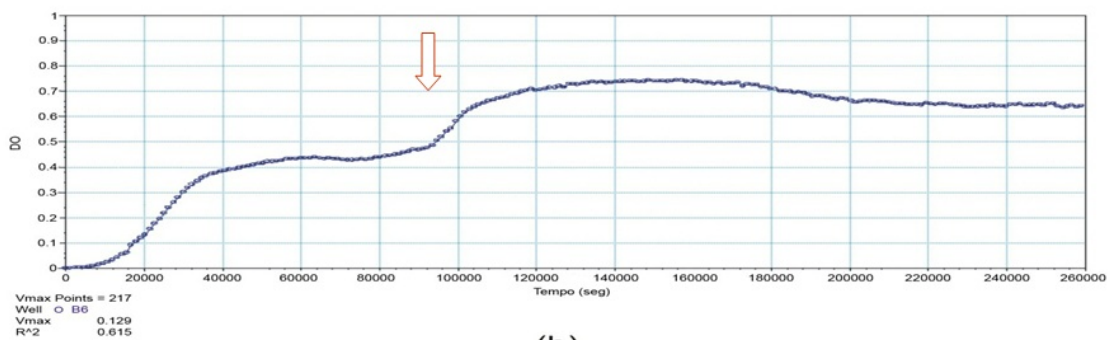
O crescimento da linhagem *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 cultivada na presença de diferentes tipos de açúcares está descrito na figura 4.1. A curva de crescimento apresentada nos painéis A e B se referem ao crescimento de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 em meio mínimo contendo Maltose e Maltose + N-acetilglicosamina, respectivamente (Figura 4.1). As análises de expressão gênica por meio de microarranjos foram realizadas no tempo de 24 horas após o inóculo.

No tratamento apenas com Maltose, a fase de crescimento exponencial da linhagem *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 dura aproximadamente 11 horas. Depois deste período, a linhagem passa por uma breve fase estacionária (entre 11 e 20 horas), voltando a apresentar crescimento moderado até o final do experimento.

Já no tratamento com Maltose + N-acetilglicosamina, ocorreram duas fases de crescimento exponencial (entre 1 e 11 horas e entre 22 e 27 horas). Próximo às 44 horas de experimento, a linhagem entra em uma fase estacionária até o final do experimento. Como a curva do tratamento Maltose + N-acetilglicosamina apresenta duas fases exponenciais, foi selecionado o tempo de 24 horas que corresponde ao início da utilização da N-acetilglicosamina para análise da expressão gênica.



(a)



(b)

Figura 4.1: Curva de crescimento de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (a) em meio M9 com Maltose (b) Maltose e N-acetilglicosamina. (Densidade Óptica X Tempo [em segundos]). Uma unidade de densidade óptica (OD) corresponde a  $10^9$  unidades formadoras de colônia (CFU) por mililitro ( $1 \text{ OD} = 10^9 \text{ CFU/mL}$ ). O seta marca o ponto de 24 horas.

## 4.2 Extração do RNA de *V. parahaemolyticus*

A linhagem RIMD2210633 de *V. parahaemolyticus* foi cultivada em meio mínimo M9 adicionada de duas fontes de energia diferentes, maltose e n-acetilglicosamina. O cultivo bacteriano foi feito em condições aeróbicas, sob baixa agitação, a  $28^\circ\text{C}$ . Foram retiradas duas amostras do cultivo no tempo de 24, 44 e 72 horas após o

início do experimento a fim de realizar a extração de mRNA e a preparação do cDNA. A maior parte das observações deste estudo esta no ponto de 24 horas.

As misturas de cDNA preparadas a partir do RNA extraído foram utilizadas em hibridizações contra lâminas de microarranjo contendo um total de 4832 ORFS do genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633. Foram realizados 2 experimentos independentes de hibridização. O resultado das hibridizações foi visualizado com o uso do scanner ScanArray Express Lite que permite a detecção e a quantificação da fluorescência, através do software ScanArray Express (Perkin Elmer). Análises adicionais de bioinformática foram realizadas para garantir a qualidade e significância dos resultados.

#### 4.2.1 Qualidade do RNA

A concentração de RNA determinada pela medida de absorvância (260 nm) variou de 1006 a 2877 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (1 unidade de Abs a 260 nm corresponde à 40 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de RNA). Já a integridade do RNA foi checada em gel de agarose (Figura 4.2). Ficou evidente a integridade das bandas de RNA que representam o RNAr 23S, 16S e 5S da amostra corada com brometo de etídeo, indicando que não houve degradação do RNA durante a sua extração com o kit RNeasy. As colunas 1, 2 e 11 representam o cultivo em maltose, as colunas 3 e 4 descrevem o cultivo em maltose + quitina, as colunas 5 e 6 representam o cultivo em maltose + NAG, as colunas 7 e 8 descrevem o cultivo em quitina e as colunas 9 e 10 demonstram o cultivo de NAG. Vemos claramente as três bandas 5S, 16S e 23S nos tratamentos de maltose, maltose + NAG e NAG enquanto nos tratamentos maltose + quitina e quitina o RNA estava visivelmente degradado, porém a causa não é conhecida uma vez que as amostras apresentando degradação de RNA foram preparadas em conjunto com as amostras sem degradação. Os marcadores na coluna C são de tamanho de 100bp.

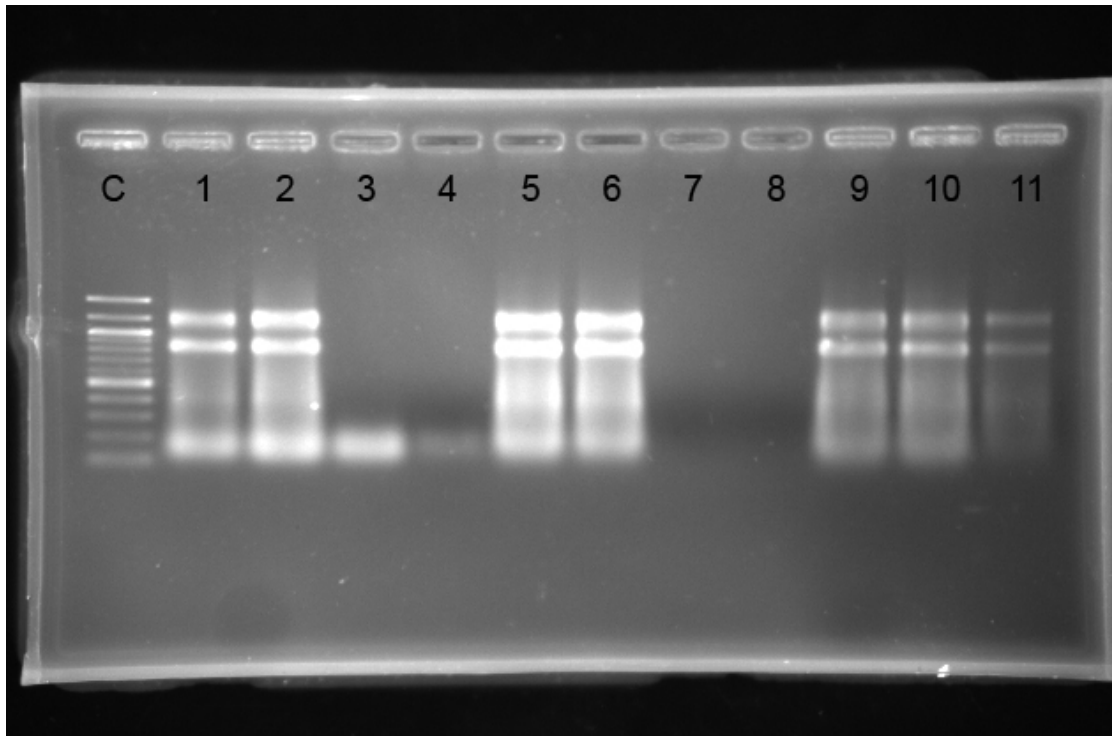


Figura 4.2: RNA de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 extraído e visualizado em gel de agarose 1%, após marcação com brometo de etídeo.

### 4.3 Análise do resultado de hibridização das lâminas de microarranjo

A partir dos dados gerados pela detecção de sinais de fluorescência emitidos pelas lâminas hibridizadas, foi realizado um estudo comparativo para determinar as diferenças de expressão gênica de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 em resposta à presença de NAG no cultivo. Foram considerados genes induzidos aqueles que apresentaram nível de expressão maior no tratamento com N-acetilglicosamina do que no tratamento controle (apenas com Maltose). Já os genes reprimidos foram aqueles com níveis de expressão menor no tratamento N-acetilglicosamina do que no tratamento controle (apenas com Maltose).

Um exemplo de visualização da lâmina de microarranjo está apresentado na Figura 4.3. A imagem representa uma correspondência entre os níveis de sinais detectados e a medida de expressão de alguns dos genes do *V. parahaemolyticus* RIMD2210633. A imagem (A) representa o resultado da hibridização do mRNA no

tratamento Maltose contra a lâmina de microarranjo, enquanto a imagem (B) representa o resultado da hibridização no tratamento Maltose + N-acetilglicosamina e a imagem (C) representa a comparação entre os níveis de transcrição de mRNA em cada tratamento: Maltose e Maltose + N-acetilglicosamina. Nesta análise comparativa, quando o nível de expressão de um gene específico foi maior no cultivo com N-acetilglicosamina e Maltose, os pontos de coloração eram representados em vermelho, correspondendo a genes induzidos por NAG. Por outro lado, se o a expressão foi maior no cultivo apenas com Maltose, os pontos de coloração eram verde, representando os genes reprimidos por NAG. Já quando os pontos foram indicados com cor entre amarelo e laranja, o nível de expressão gênica nos dois tratamentos foi similar ou com variação considerada não significativa. Os pontos com coloração próxima do preto são aqueles onde não ocorreu hibridização, uma vez que o mRNA específico não foi transcrito ou a transcrição ocorreu em níveis abaixo da detecção da técnica utilizada.

Contudo, a análise comparativa, entre o tratamento e o controle, da expressão gênica de *V. parahaemolyticus* resultou na detecção de 59 genes com expressão induzida, 38 genes reprimidos, 523 Genes tiveram falha na leitura do sinal e 4245 não tiveram a expressão significativa na presença de NAG no cultivo, comparado ao cultivo controle apenas com maltose.

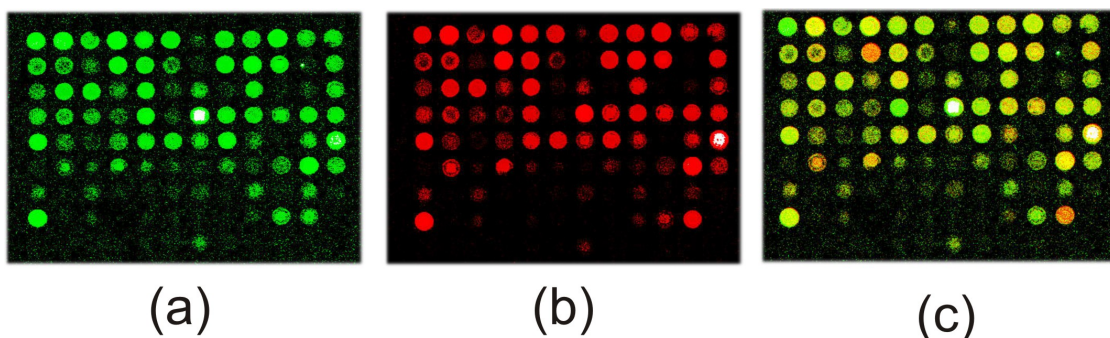


Figura 4.3: Laminas do experimento do microarranjo. (a) genes que foram expressos na presença de maltose, (b) genes que foram expressos na presença de maltose + NAG e (c) sobreposição da imagens (a) e (b).

#### 4.4 Categorias funcionais de genes com expressão induzida ou reprimida na presença de N-acetilglicosamina

Do conjunto total de genes com expressão alterada em resposta à NAG, alguns são nomeados como hipotéticos, que corresponde a genes cujas proteínas tenham sido previstas no genoma, mas para as quais não há evidência experimental de expressão in vivo ou in vitro, e hipotéticos conservados, os quais apresentam ortólogos em outros organismos, de acordo com a anotação prévia determinada no trabalho de sequenciamento do genoma da linhagem *V. parahaemolyticus* RIMD2210663 (Tabela 4.1).

Com exceção destes genes hipotéticos, 34 e 22 genes com expressão induzida e reprimida, respectivamente, foram classificados de acordo com as categorias funcionais do banco de dados online TIGR-CMR (J. Craig Venter Institute - Comprehensive Microbial Resource, <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). A maioria dos genes com expressão induzida pertenceu a classes de transporte, de metabolismo de energia, e funções regulatórias. Por outro lado, a maioria dos genes com expressão reprimida foi classificada dentro das classes de metabolismo de energia, transcrição e endereçamento de proteínas (Figura 4.4).

#### 4.5 Genes induzidos pela N-acetilglicosamina após 24 horas de cultivo

Um total de 59 genes (39 genes localizados no cromossomo I e 20 genes localizados no cromossomo II) apresentou sua expressão aumentada significativamente ( $p < 0.05$ ) em resposta à NAG. Vinte e um destes genes são considerados hipotéticos (Tabela 4.1). De acordo com a classificação funcional, pôde-se observar que cinco genes codificaram enzimas associadas ao metabolismo de energia, nove genes estão relacionados a proteínas de transporte e ligação, dois genes estão associados ao metabolismo intermediário central, cinco genes são relacionados a funções regulatórias, três genes são ligados a processos celulares, um gene associado com tradução de sinal, um gene relacionado a proteínas associadas com modificações

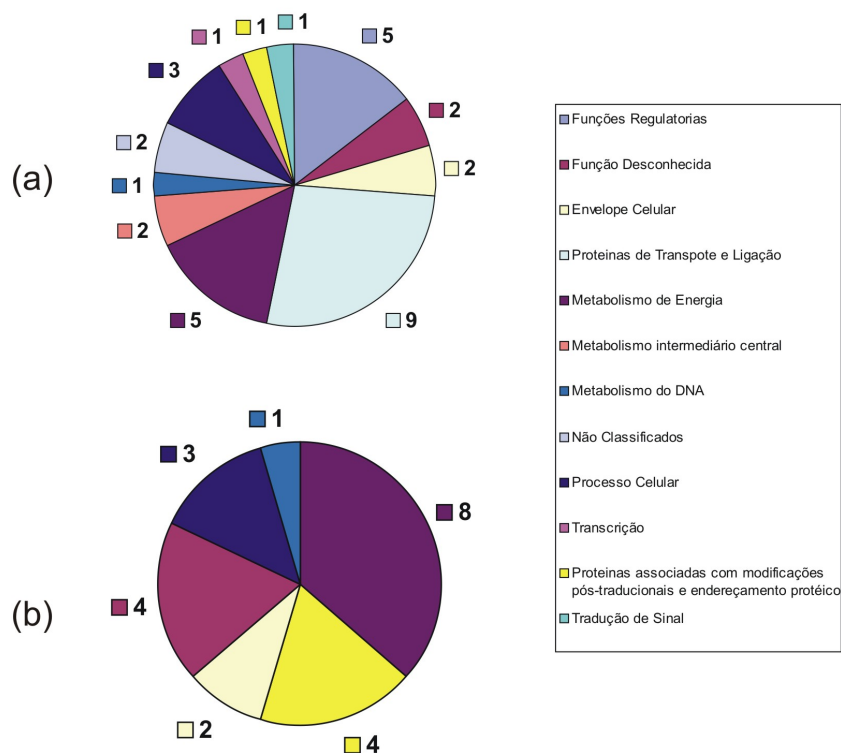


Figura 4.4: Classificação funcional de genes de *V. parahaemolyticus* induzidos e reprimidos por NAG. (a) Genes Induzidos (34) e (b) Genes Reprimidos (22). Classificação funcional de acordo com TIGR-CMR (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). Foram suprimidos os genes classificados como proteínas hipotéticas.

pós-traducionais e endereçamento protéico, um gene de transcrição e ainda três genes com funções desconhecidas e outros seis genes que não puderam ser classificados.

Pelo menos quatro genes induzidos (VP0828, VP0829, VP0831, e VPA0038) estão associados com a assimilação e o metabolismo da N-acetilglicosamina (Tabela 4.1), o que corrobora os resultados deste trabalho sobre o efeito da N-acetilglicosamina no crescimento de *V. parahaemolyticus* RIMD2210663.

Tabela 4.1: Genes de *V. parahaemolyticus* RIMD2210663 induzidos pela presença de NAG no cultivo.

<b>N° do Gene<sup>a</sup></b>	<b>Nome do Produto Gênico<sup>b</sup></b>	<b>Função Celular<sup>c</sup></b>
VP0358	<i>Regulador transcricional, família DeoR</i>	Função Regulatória
VP0401	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0585	<i>Possível proteína AcuB de utilização da acetoína</i>	Função Desconhecida
VP0704	<i>Lipoproteína YaeC (MetQ)</i>	Envelope Celular
VP0710	<i>Componente IIBC específico para trealose, sistema PTS</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VP0711	<i>Trealose-6-P hidrolase</i>	Metabolismo de Energia
VP0728	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Proteínas hipotéticas
VP0756	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0802	<i>Possível proteína exportadora</i>	Função Desconhecida
VP0828	<i>N-acetilglucosamina repressor (nagC)</i>	Função Regulatória
VP0829	<i>N-acetilglucosamina-6-P deacetilase (nagA)</i>	Metabolismo intermediário central
VP0830	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0831	<i>Componente IIABC específico para N-acetilglucosamina, sistema PTS (nagE)</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VP0969	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Proteínas hipotéticas
VP1156	<i>Proteína inibidora relacionada a Id-2 de ligação ao DNA</i>	Metabolismo de DNA
Continua na próxima página		



Tabela 4.1 – continuação da página anterior

N° do Gene <sup>a</sup>	Nome do Produto Gênico <sup>b</sup>	Função Celular <sup>c</sup>
VP1229	<i>Proteína do sistema antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup></i>	Não classificado
VP1241	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Não classificado
VP1481	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Não classificado
VP1593	<i>Fator de modulação do ribossomo</i>	Síntese de proteínas
VP1602	<i>Possível NAD-glutamato desidrogenase</i>	Não classificado
VP1650	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Proteínas hipotéticas
VP1706	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VP1707	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VP2041	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VP2127	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VP2167	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Não classificado
VP2205	<i>Fosfohistidina fosfatase</i>	Função Regulatória
VP2388	<i>Fosfohistidina fosfatase</i>	Metabolismo de Energia
VP2392	<i>Proteína relacionada a Metionil-tRNA sintetase</i>	Função Desconhecida
VP2394	<i>Proteína da família simporter sódio-galactosídeo</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VP2400	<i>UDP-glucose 4-epimerase</i>	Metabolismo de Energia
VP2479	<i>Transportador ABC de peptídeo, proteína periplasmática ligante de peptídeo</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VP2487	<i>N,N-diacetilquitobiose fosforilase</i>	Metabolismo de Energia
Continua na próxima página		

Tabela 4.1 – continuação da página anterior

N° do Gene <sup>a</sup>	Nome do Produto Gênico <sup>b</sup>	Função Celular <sup>c</sup>
VP2523	<i>Pilina tipo IV, PilA</i>	Proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico
VP2629	<i>Proteína de quimiotaxia aceptora de Metil</i>	Processos celulares
VP2699	<i>Possível MshF, proteína da biogênese de MSHA</i>	Processos celulares
VP2844	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VP2900	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP2935	<i>Proteína de ligação a RNA</i>	Transcrição
VPA0002	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0003	<i>Transportador ABC de peptídeo, proteína ligante de ATP</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VPA0004	<i>Transportador ABC de peptídeo, proteína ligante de ATP</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VPA0038	<i>Glucosamina-6-P isomerase (nagB)</i>	Metabolismo intermediário central
VPA0055	<i>Quitinase</i>	Metabolismo de Energia
VPA0056	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0101	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0219	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0460	<i>Fator PAS</i>	Proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico
Continua na próxima página		

**Tabela 4.1 – continuação da página anterior**

N° do Gene <sup>a</sup>	Nome do Produto Gênico <sup>b</sup>	Função Celular <sup>c</sup>
VPA0466	<i>Proteína A de estresse universal</i>	Processos celulares
VPA0570	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0588	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0797	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0942	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VPA1086	<i>Transportador ABC de Ribose, proteína ligante de ATP</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VPA1087	<i>Transportador ABC de Ribose, proteína ligante de ATP</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação
VPA1423	<i>Regulador transcricional</i>	Função Regulatória
VPA1572	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA1665	<i>Possível regulador do sistema dois-componentes de resposta</i>	Função Regulatória
VPA1667	<i>Componente IIBC específico para glucose, sistema PTS</i>	Proteínas de Transporte e de Ligação

a) identificação do gene no genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210663; b) anotação do produto gênico disponível no genoma disponível; c) classificação de acordo com TIGR-CMR.

#### **4.6 Genes reprimidos pela N-acetilglicosamina após 24 horas**

O conjunto de genes que apresentaram diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) no nível de expressão inclui 38 genes (26 genes localizados no cromossomo I e 12 genes localizados no cromossomo II) e estão listados na tabela 4.2.

Dos genes que foram reprimidos treze genes codificam proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas, oito genes codificam proteínas associadas ao metabolismo de energia, quatro genes codificam proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico, dois genes estão ligados ao envelope celu-

lar, um gene associado ao metabolismo de DNA e três genes são relacionados a processos celulares.

Tabela 4.2: Genes de *V. parahaemolyticus* RIMD2210663 reprimidos pela presença de NAG no cultivo.)

<b>N° do Gene<sup>a</sup></b>	<b>Nome do Produto Gênico<sup>b</sup></b>	<b>Função Celular<sup>c</sup></b>
VP0081	<i>Possível proteína periplasmática induzida por hiperosmolaridade</i>	Proteínas hipotéticas
VP0082	<i>Possível proteína transmembrana</i>	Proteínas hipotéticas
VP0083	<i>Proteína hipotética</i>	Envelope Celular
VP0086	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0087	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0088	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0089	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP0356	<i>Piruvato cinase I</i>	Metabolismo de Energia
VP0357	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VP0433	<i>Protease DO</i>	Proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico
VP0510	<i>Proteína DsbCde troca entre tiol:disulfeto</i>	Proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico
Continua na próxima página		

Tabela 4.2 – continuação da página anterior

N° do Gene <sup>a</sup>	Nome do Produto Gênico <sup>b</sup>	Função Celular <sup>c</sup>
VP0535	<i>Lipoproteína peptidase sinal</i>	Proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico
VP0583	<i>Malato sintase A</i>	Metabolismo de Energia
VP0584	<i>Isocitrato liase</i>	Metabolismo de Energia
VP0636	<i>Proteína de membrana externa A (ompA)</i>	Envelope Celular
VP0647	<i>Pequena proteína A</i>	Função Desconhecida
VP0868	<i>Possível lipoproteína de membrana Slp</i>	Envelope Celular
VP1106	<i>Proteína de membrana carreadora de lipoproteínas</i>	Proteínas associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico
VP1189	<i>Proteína híbrida; similar a homóloga prismane</i>	Função Desconhecida
VP1261	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VP1278	<i>Possível proteína relacionada a SpoOM</i>	Função Desconhecida
VP1718	<i>Citocromo peroxidase c551</i>	Processos celulares
VP2725	<i>Proteína hipotética</i>	Função Desconhecida
VP2779	<i>Proteína hipotética conservada</i>	Proteínas hipotéticas
VP2811	<i>Proteína do flagelo polar tipo só-dio MotX</i>	Processos celulares
Continua na próxima página		

**Tabela 4.2 – continuação da página anterior**

<b>N° do Gene<sup>a</sup></b>	<b>Nome do Produto Gênico<sup>b</sup></b>	<b>Função Celular<sup>c</sup></b>
VP2821	<i>Possível proteína ligante de nucleotídeo</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0228	<i>Proteína hipotética</i>	Proteína hipotética
VPA0345	<i>Proteína hipotética</i>	Processos celulares
VPA0461	<i>Alfa-amilase</i>	Metabolismo de Energia
VPA0462	<i>Proteína hipotética</i>	Função Regulatória
VPA0523	<i>Proteína hipotética</i>	Proteínas hipotéticas
VPA0596	<i>Possível proteína de quimiotaxia aceptora de Metil</i>	Processos celulares
VPA1230	<i>Gliceraldeído 3-P desidrogenase</i>	Metabolismo de Energia
VPA1450	<i>Proteína relacionada a MoxR</i>	Função Desconhecida
VPA1619	<i>4-alfa-glucanotransferase</i>	Metabolismo de Energia
VPA1638	<i>Possível precursor de pululanase</i>	Metabolismo de Energia
VPA1641	<i>Possível amilase maltogênica</i>	Metabolismo de Energia
VPA1642	<i>Possível proteína CymC</i>	Metabolismo de DNA

a) identificação do gene no genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210663; b) anotação do produto gênico disponível no genoma disponível; c) classificação de acordo com TIGR-CMR.

#### **4.7 Dendogramas**

A partir das tabelas geradas pela leitura do microarranjo, foram construídos dendogramas utilizando o toolbox de bioinformática do MATLAB.

Nas figuras ( 4.5 e 4.6) temos os dendogramas que representam o comportamento dos genes estudados durante o experimento em 3 pontos de observações, 24 (coluna A), 44(coluna B) e 72 (coluna C) horas. Os dendogramas foram gerados utilizando o Toolbox de Bioinformatica do Matlab. O script feito encontra-se disponível nos anexos desta dissertação.

O dendrograma 4.5 mostra o comportamento dos genes que foram induzidos na presença de NAG, quanto mais azul, mais induzido está o gene e quanto mais vermelho menos induzido. Enquanto o dendrograma 4.6 mostra o comportamento dos genes que foram reprimidos, quanto mais azul, menos reprimido estão os genes e quando mais vermelho mais reprimido.

Podemos notar que no dendrograma 4.5 existem 3 clusters bem distintos. No primeiro cluster temos os genes que tiveram a indução mais tardia. No segundo cluster temos os genes que tiveram uma expressão significativa no início das observações e foram decaindo com o passar do tempo. O terceiro cluster contém os genes que tiveram uma indução significativa durante todo o experimento.

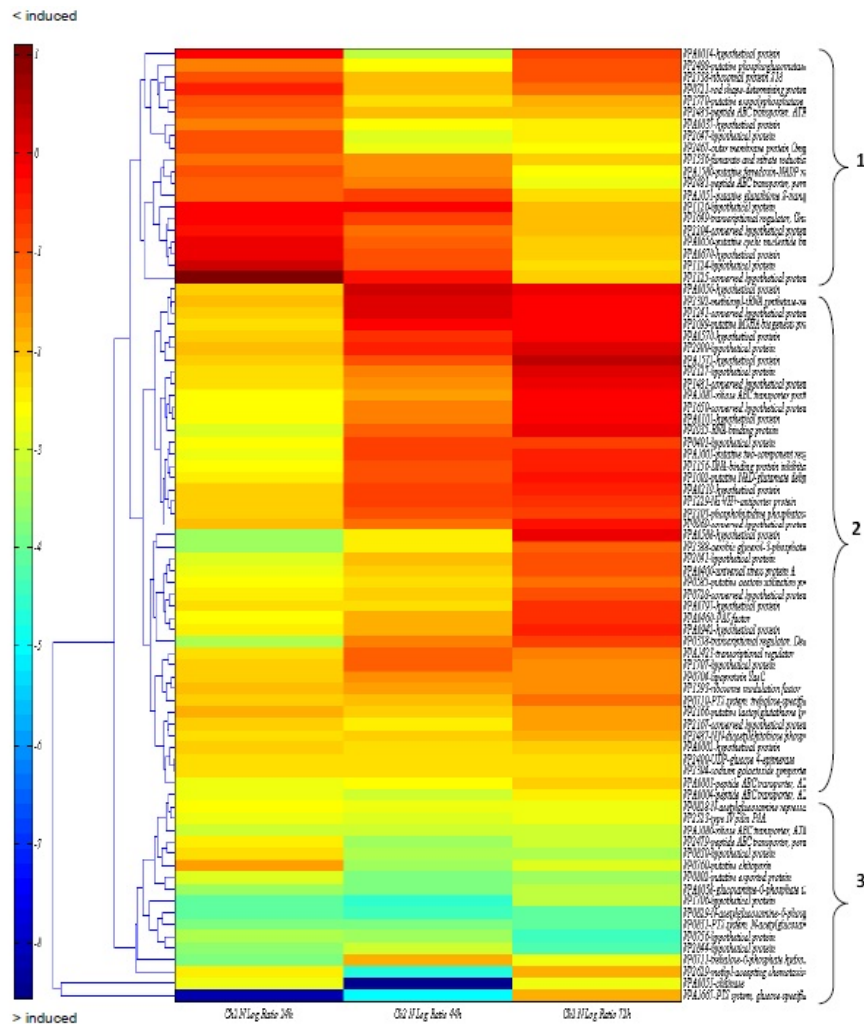


Figura 4.5: Dendrograma dos genes induzidos.

No dendrograma 4.6 podemos observar a existencia de 3 clutes bem definidos. No primeiro cluster estão os genes que a repressão ocorreu de forma mais tardia. O segundo cluster contém os genes que tiveram um índice de repressão moderada durante todo o experimento. No terceiro cluster temos os genes que tiveram uma repressão significativa durante todo o experimento.

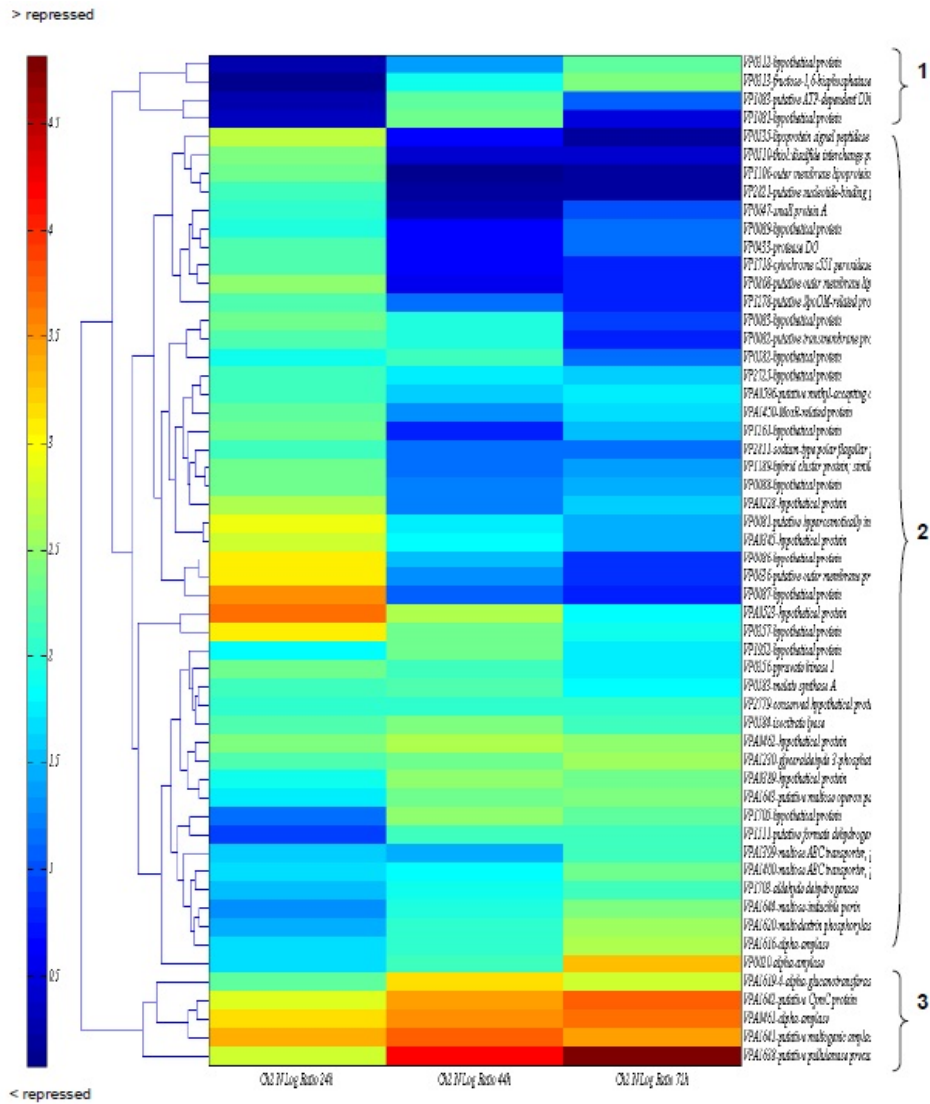


Figura 4.6: Dendrograma dos genes reprimidos.



# Capítulo 5

## Discussão

Com o intuito de determinar o efeito da NAG na expressão gênica da bactéria marinha *V. parahaemolyticus* RIMD2210633, foram realizados experimentos de cultivo e de análise da expressão gênica por meio de microarranjos. Neste trabalho ficou evidente que a NAG influencia a expressão gênica de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633. Uma coleção de genes parece ser induzida enquanto que outra parcela dos genes parecem ser reprimidos em resposta ao cultivo na presença de NAG

### 5.1 Curva de crescimento

Ao comparar as duas curvas de crescimento (Figura 4.1 A e B) é possível notar que ambas apresentam uma fase de crescimento inicial semelhante, até o período próximo das 11 horas. Nesta fase, a curva de crescimento representada na figura 4.1(A), que utiliza a Maltose como fonte única de energia e carbono, apresenta-se na fase exponencial com taxa de aumento populacional similar à curva de crescimento visualizada na figura 4.1 (B), onde o meio é composto de Maltose e NAG. Esta mesma proporção de crescimento pode indicar uma preferência do organismo pela fonte de energia Maltose (Kirchman, 2000), em comparação com o uso de NAG como fonte de energia. Entre 11 e 22 horas é notável que a taxa de crescimento foi reduzida. Em ambas as curvas isto ocorre devido ao aumento populacional e a concomitante redução da maltose.

Depois das 23 horas são notados comportamentos diferentes entre as curvas. A curva A (tratamento com maltose) segue em uma taxa constante de crescimento moderado que persiste até o final do experimento. Na curva A pode ser observado que até o final do experimento ela não entra em uma fase estacionaria. Enquanto a curva 4.1 (B) entra em um novo estágio de crescimento exponencial, similar a sua fase inicial porem, mais curta. Este resultado ocorre devido à presença de uma segunda fonte de energia, a NAG. Durante o intervalo de tempo da primeira para a segunda fase de crescimento da figura 4.1 (B), entre 11h e 23h, pode se supor que o organismo entra em um estágio de ajuste na maquinaria de obtenção de energia, ou seja, há uma mudança na expressão gênica. Esta mudança na expressão gênica é necessária para ajustar a especificidade no sistema de transporte celular e nas vias metabólicas de utilização da fonte de energia, de Maltose para NAG. Em seguida, após as 33 horas a curva 4.1 (B) entra em uma fase estacionaria que se prolonga até o final do experimento, devido à diminuição da disponibilidade do segundo açúcar. Levando em consideração os dados das curvas de crescimento, o tempo de 24 horas de cultivo foi determinado para extração de RNA a análise de transcriptomas por microarranjo. Um fato importante foi a concentração dos açúcares utilizada nos cultivos: no tratamento apenas com Maltose (curva 4.1 (A) a concentração usada foi de 5g/l, enquanto que no tratamento com Maltose e o NAG foram adicionados 5g/l de cada um dos açúcares.

## **5.2 Análise de transcriptomas**

A análise de transcriptomas de *V. parahaemolyticus* permitiu a detecção de clusters gênicos com expressão alterada em resposta à modificação da fonte de energia e carbono de Maltose para NAG. De uma total de 3885 genes analisados, a grande maioria não apresentou variação no nível transcricional em resposta à utilização de NAG pela bactéria. Isso indica que há uma pequena mudança fisiológica em resposta às fontes de energia e carbono utilizadas.

No entanto, foi observado que a presença de NAG no cultivo foi capaz de

induzir o nível de transcrição de 59 genes de *V. parahaemolyticus*. Estes genes codificam proteínas envolvidas na colonização, no transporte, assimilação e utilização da NAG dentro da bactéria. Em contrapartida, 38 genes apresentaram os níveis transcricionais reprimidos em resposta ao cultivo com NAG. Foram visualizados 34 genes hipotéticos ou hipotéticos conservados com os níveis transcricionais alterados em resposta ao cultivo com NAG. A simples detecção de moléculas de RNA transcrito já indica que estes genes não são mais hipotéticos, mas sim genes reais com função desconhecida. Além disso, a regulação gênica destes genes em resposta à NAG fornece um vasto campo de estudo de mecanismos genéticos e metabólicos envolvidos que merecem uma análise posterior mais aprofundada.

Grande parte dos genes que apresentou expressão alterada em resposta à NAG possui funções referentes ao transporte e ligação de substrato (genes induzidos) e ao metabolismo de energia (genes reprimidos). De fato, estes dois mecanismos são os primeiros a serem modificados na bactéria em resposta às modificações ambientais. O primeiro passo para que a bactéria utilize uma nova fonte de energia e carbono, que neste estudo é a NAG, é a síntese de novos sistemas de quimiotaxia, detecção da fonte e transporte para dentro da célula. O sistema de transporte permite que organismo adquira materiais para a biossíntese e produção de energia e libera no ambiente os subprodutos de seu metabolismo. Este sistema possui proteínas específicas para reconhecer e transportar fontes de energia e outros materiais para dentro da célula. Dentro da célula, a presença da fonte de carbono e energia promove uma modificação fisiológica para sintetizar uma nova maquinaria metabólica específica. Em paralelo, uma série de genes que codificam proteínas (transportadores e enzimas) específicas para a fonte de carbono inicial são reprimidos para que o gasto de energia de bactéria seja reduzido e eficaz (Neidhardt, 1999).

### 5.3 Genes induzidos pela N-acetilglicosamina

O grupo de genes induzidos (59 genes) compreende genes cuja concentração de transcritos foi aumentada no tratamento com Maltose + NAG em resposta ao tratamento apenas com Maltose. A maioria dos genes induzidos (nove genes) na presença de N-acetilglicosamina codifica proteínas do sistema de transporte e ligação. Os genes foram VP0710, VP0831, VP2394, VP2479, VPA0003, VPA0004, VPA1086, VPA1087 e VPA1667.

O processo de transporte do NAG para dentro de vibrios começa com atração da bactéria pelo açúcar, que é transportado pela proteína NagE para dentro da célula. NagE pertence ao sistema fosfotransferase (*phosphotransferase system* - PTS). Este sistema catalisa a transferência de grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para os seus substratos de açúcar e concomitantemente transloca os açúcares através da membrana bacteriana. Durante o seu transporte, a NAG é então fosforilada, recebendo um ligação 6-fosfato e passa a ser N-acetilglicosamina-6-fosfato (NAG-6P) (Plumbridge, 1989, 1999, 2000). Neste estudo, com *V. parahaemolyticus*, o genes que codifica o transportador NagE (VP0831) foi induzido em resposta à NAG. Com o açúcar dentro do organismo a próxima etapa do processo é degradar o NAG para uma fonte de energia mais simples.

O resultado do experimento mostra que 13 genes responsáveis pelo metabolismo de energia e 2 genes responsáveis pelo metabolismo intermediário central tiveram sua expressão aumentada na presença de NAG. Os genes do metabolismo intermediário são estritamente ligados a degradação de NAG, sendo o VP0829 (*nagA*) e o VPA0038 (*nagB*). O processo de degradação da NAG resulta na produção de um açúcar mais simples, a Frutose-6-Fosfato. Para isto, a proteína NagA (codificada pelo gene VP0829, *nagA*) degrada o NAG-6P (NAG-6-fosfato) em GlcN-6P (glucosamina-6-fosfato) e acetato por uma processo de deacetilação. Em seguida o GlcN-6P sofre ação de NagB e se transforma em Fru-6P (Frutose-6-Fosfato) e NH<sub>3</sub>. Fru-6-P deixa a via do metabolismo de açúcar e passa a via da Glicólise (KEGG).

Além dos genes *nagA*, *nagE* e *nagB*, os outros genes do operon *nag* também

foram induzidos por NAG, tais como o repressor do operon *nagC* (VP0828) e o gene hipotético localizado no meio do operon (VP0830). De fato, está claro que a presença de NAG e também a ausência de glicose (monômero da maltose) no cultivo promove a indução destes genes do operon *nag* e de dezenas de outros genes que possivelmente fazem parte de um regulon *nag* em *V. parahaemolyticus*. Uma vez que nesta bactéria a organização dos genes *nag* é similar à *V. cholerae*, supõe-se que a regulação possa ser similar. A indução do operon *nag* pode ocorrer de maneira dependente do repressor NagC já descrita para outros vibrios ( Figura 5.1; (Plumbridge e Kolb, 1991; Soares, 2000; Santos, 2005; Meibom et al., 2004)), ou com o auxílio de outros fatores de transcrição (Sohanpal et al., 2004; Barnhart et al., 2006).

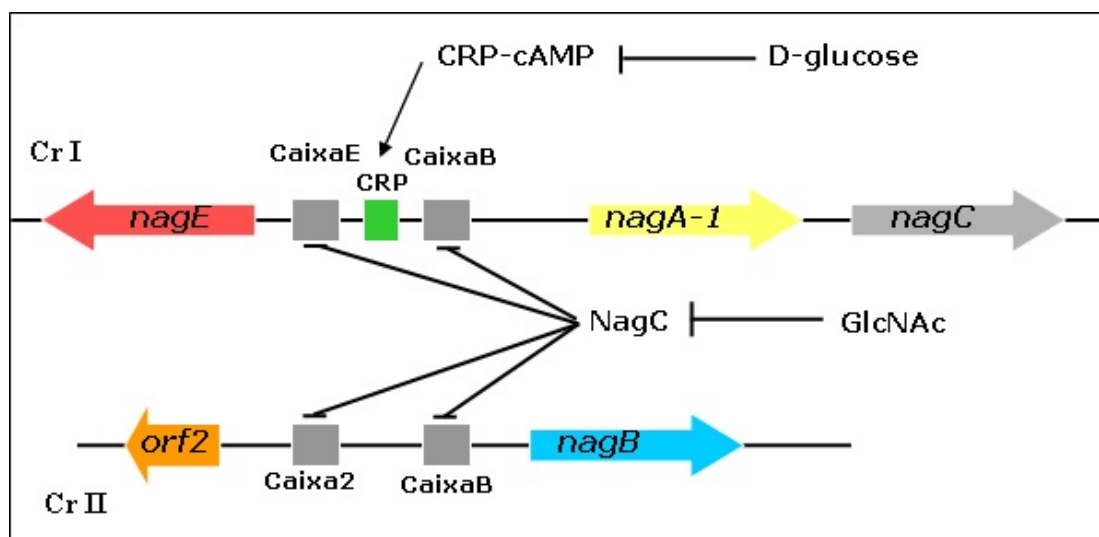


Figura 5.1: Operon *nag* de *V. cholerae*. CaixaE, CaixaB, e Caixa2 são sítios de ligação do repressor NagC e CRP é o sítio de ativação de CRP-cAMP. Regulação proposta por Soares, 2000 e Santos, 2005: Todos os genes *nag* sofrem repressão transcricional pela ligação de NagC aos sítios específicos (caixas), o que pode ser impedido pela presença de NAG. Os genes *nagE* e *nagA-1* também podem ser ativados pela ação de CRP-cAMP, exceto na presença de D-glucose (Repressão catabólica).

A partir da degradação da NAG-6-P é liberado dentro da célula acetato, furtose-6-P e NH<sub>3</sub>. Esta liberação de acetato e NH<sub>3</sub> é um ponto crucial de diferença entre os estados metabólicos de *V. parahaemolyticus* cultivado na presença

de NAG ou Maltose. Em particular, o gene VP0585 que codifica uma possível proteína AcuB de utilização da acetoína foi detectado com induzido. Segundo Pappadopoulou e Sealy-Lewis (1999) a proteína codificada por este gene no fungo *Aspergillus* possui a função parecida com a proteína FacB que faz a degradação do acetato (Todd et al., 1997). Ainda neste âmbito, o gene VP1602 que codifica uma possível NAD-glutamato desidrogenase também foi induzido por NAG. Esta proteína é capaz de transformar amônia em L-glutamato e vice-versa. Já que no cultivo com NAG imagina-se que há uma grande quantidade de amônia (NH<sub>3</sub>) dentro da célula, este excesso deve estar sendo direcionado para a produção de glutamato, que, por sua vez, é um sinalizador intracelular de quantidade de nitrogênio disponível no meio externo (Plumbridge, 1990; Plumbridge e Kolb, 1991). Imagina-se, portanto, que as proteínas codificadas pelos genes VP0585 e VP1602 esteja atuando na utilização dos excessos de acetato e amônia liberados pela degradação de NAG dentro das células de *V. parahaemolyticus*.

Alguns genes do metabolismo de energia que foram induzidos foram VP0711, VP2388, VP2400, VP2487, VPA0055. Um fato interessante é a indução da expressão do gene VPA0055 que codifica para uma quitinase no cromossomo 2, que é responsável pela degradação da quitina em NAG ou em quitooligômeros, tais como quitobiose (NAG<sub>2</sub>) (KEGG, Kyoto *Encyclopedia of Genes and Genomes*; (Keyhani e Roseman, 1999)), mesmo sem a presença de quitina no cultivo. Uma hipótese para que este fato aconteça é que a percepção da presença de NAG por *V. parahaemolyticus* pode indicar uma possível fonte maior de quitina (composta por monômeros de NAG) no ambiente próximo e, portanto, isso deve servir de *start* para que a bactéria comece a preparar o mecanismo para o transporte e degradação da quitina. Em concordância com isso, o gene VP2487, induzido, codifica a proteína N,N-diacetilquitobiose fosforilase, uma novel fosforilase descrita em *V. furnissii* (ChbP), que promove a reação reversível de quitobiose em NAG-1P e NAG dentro da célula (Roseman e Baenziger, 2000).

De fato, em uma análise de transcriptoma de *V. cholerae* para identificar

grupos de genes envolvidos na utilização de NAG e outros oligossacarídeos de NAG, em comparação com genes expressos pela bactéria planctônica em água do mar, foi demonstrado que NAG é capaz de induzir não só o operon *nag*, mas também uma quitinase VCA0811 do cromossomo II, uma proteína de quimiotaxia (VC0449) e outros. Em *V. parahaemolyticus* pode-se supor que os genes VP2487, VPA0055 e o VP2629 (Proteína de quimiotaxia) fazem parte de uma regulon *nag* que responde à presença de NAG no meio de cultivo.

Com base em observações das vias metabólicas no KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) podemos induzir a funcionalidade de alguns genes que foram expressos com maior intensidade na presença de NAG. O glicerol-3-P desidrogenase (VP2388) codifica uma proteína que converte Glicerone-P e sn-Glicerone-3-P e vice-versa e participa do metabolismo de glicerofosfolipídeos. O gene VP2400 codifica a proteína UDP-glucose 4-epimerase, que transforma de UDP-glucose em UDP-galactose e o caminho inverso, sendo atuante no metabolismo da galactose. No entanto, com os dados obtidos neste estudo, não se pode supor alguma hipótese para o aumento de expressão destes genes no cultivo com NAG.

Foram detectados alguns possíveis operons induzidos por NAG. Um exemplo foi o operon composto pelos genes VP0710 e VP0711. VP0710 codifica para uma proteína de membrana que é o componente IIBC específico para trealose (treP) do sistema de transporte PTS, um transportador que leva a Trealose para dentro da célula, e adiciona concomitantemente grupo fosfato. Como resultado, trealose extracelular é assimilado como trealose-6-P intracelular, que é transformado por trealose-6-P hidrolase (VP0711, treC) em D-Glicose-6P. Em *E. coli* e *B. subtilis*, treC e treP estão organizados em um operon induzido por trealose 6-P e negativamente regulado por repressão catabólica, assim como por um repressor TreR (Arguelles, 2000; Burklen et al., 1988; Arguelles, 2000). Com isso, imagina-se que a simples escassez de glicose extracelular no cultivo de *V. parahaemolyticus* possa ser um sinal de indução ou de não repressão para este operon.

Outro possível operon é formado por VPA1086 e VPA1087 que codificam re-

spectivamente as proteínas RbsA e RbsD (Transportador ABC de Ribose, proteína ligante de ATP) que são responsáveis pela assimilação de D-ribose para dentro da célula (KEGG). As proteínas OppA, OppD e OppF (Transportador ABC de peptídeo, proteína ligante de ATP) formam um Transportador ABC que é responsável pelo transporte de peptídeo e níquel para dentro da célula e eles são codificados respectivamente pelos genes VP2479, VPA0004 e VPA0003, que foram induzidos em resposta à NAG. Parece existir um operon formado por VPA002 (proteína hipotética), VPA003 e VPA004 em *V. parahaemolyticus* que é induzido em resposta ao cultivo em NAG.

Um outro gene que teve sua expressão aumentada na presença de NAG foi o que codifica a Pilina tipo IV, utilizada na produção do pilus do tipo IV, que está associado à competência em muitas espécies bacterianas. Segundo Meibom et al. (2004, 2005) *V. cholerae* se torna competente para transformação de fragmentos genômicos de outras linhagens, na presença de quitina. Foi proposto que a competência para transformação em *V. cholerae* requer um complexo de ligação por pilus tipo IV, uma possível proteína de ligação ao DNA e três cascatas regulatórias ativadas por determinantes ambientais, que são a presença da quitina, o aumento da densidade celular, e a limitação de nutrientes, stress ou desaceleração do crescimento. Acreditamos que o mesmo pode acontecer com *V. parahaemolyticus* porém na presença de NAG, que é um subproduto da quitina.

A proteína Lipoproteína YaeC (MetQ) codificada pelo gene VP0704 é parte de um transportador que juntamente com as proteínas MetI e MetN transporta o D-metionina para dentro da célula. Em *V. cholerae*, foi descrito uma indução do gene metQ em condições de exposição à NAG, enquanto que os demais genes do operon metQIN mostraram níveis de expressão não alterado (Meibom et al., 2004). Isso indica que pode haver um mecanismo regulatório, tanto em *V. cholerae* quanto em *V. parahaemolyticus*, apenas na expressão de yaeC, devido à alguma função adicional da proteína. Embasando esta hipótese, há estudos de antígenos de superfície de *V. vulnificus* que mostraram que o gene da lipoproteína YaeC desta espécie foi



mais expressa *in vivo*, em pacientes septicêmicos (Kim et al., 2003). YaeC, assim como outras lipoproteínas de diversas bactérias, possuem atividades antigênicas, que induzem a produção de anticorpos, via ativação de receptores do tipo Toll (TLR 2 e 6). Além disso, foi sugerido que as lipoproteínas sejam componentes de um perfil associado à patogenicidade, produzido por micro-organismos (Aliprantis et al., 1999; Hirschfeld et al., 1999; Janeway e Medzhitov, 1999; Takeuchi et al., 2001; Verjan et al., 2005).

Também ligado à patogenicidade, o gene VP2699, que codifica a proteína MshF, integrante da biogênese do pilus tipo IV MSHA (*mannose-sensitive hemagglutinin pilus*), também foi induzido. MSHA é um importante fator que estimula a aderência de *V. cholerae* a várias superfícies (inertes, ou do muco intestinal e, em particular, superfície quitinosas), além de ser primordial para a produção de biofilme (Zhang et al., 2003; Watnick et al., 1999; Chiavelli et al., 2001; Merrell et al., 2002; Meibom et al., 2004). Em *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 foram detectados dois clusters de genes que produzem pilus tipo IV. Um grupo é similar ao encontrado em bactérias Gram-negativas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* (chitin-regulated pilus; ChiRP) e *Vibrio vulnificus*. O outro é homólogo aos genes para o pilus hemaglutinina sensível à manose (MSHA). Através de estudos de mutantes, foi observado que os dois tipos de pilus tipo IV de *V. parahaemolyticus* contribuem para a formação de biofilme de maneiras diferentes, sugerindo que ambos coletivamente atuam em uma estratégia refinada para sobrevivência de *V. parahaemolyticus* em ambientes naturais (Shime-Hattori et al., 2006).

#### 5.4 Genes reprimidos pela N-acetilglicosamina

A utilização do NAG pelo organismo faz com que alguns genes não sejam utilizados para o processo de transporte, degradação e absorção do mesmo. Como resultado do experimento foi obtido uma lista, apresentada na sessão 4.6, de genes inibidos quando *V. parahaemolyticus* começa a assimilar e utilizar NAG (genes

reprimidos). A repressão da expressão destes genes provavelmente deve ocorrer devido a um ajuste de economia de energia da célula, a qual evita gastar energia para sintetizar um produto que não terá utilidade naquele instante, ou eventualmente causar até mesmo alguma interferência na via metabólica.

A maioria dos genes reprimidos é referente ao metabolismo de energia. Com base em observações das vias metabólicas no KEGG podemos induzir a funcionalidade de alguns genes que foram regulados negativamente. VP0356 e VPA1230 atuam na glicólise. O gene VP0356 codifica a proteína piruvato cinase I transforma fosfoenol-piruvato em piruvato. A proteína gliceraldeído 3-P desidrogenase (Gap) codificada pelo gene VPA1230 faz a transformação de gliceraldeído-3P em Glicerato-1,3P<sub>2</sub>. O gene que codifica esta última proteína, a Gap, já foi descrito em *B. subtilis* como sendo induzidos transcricionalmente no cultivo em altas quantidades de glicose, junto com outros genes envolvidos no metabolismo da glicólise (Tobisch et al., 1999). Em *V. parahaemolyticus*, podemos supor que gap deixou de ser induzido devido à escassez de glicose intracelular pelo início da utilização de NAG pela bactéria.

O provável operon formado por VP0583 e VP0584 mostrou-se reprimido em resposta à utilização de NAG por *V. parahaemolyticus*. A Isocitrato liase (VP0584) promove a transformação do isocitrato em succinato e Glioxilato. Esta enzima funciona como um ponto de ramificação do metabolismo de carbono (ciclo de Krebs ou TCA) que promove o desvio do isocitrato através de um caminho de conversão de carbono, o ciclo glioxilato (Fig 5.2), transpassando duas etapas do ciclo TCA (ciclo do ácido tricarbóxico), que converte isocitrato em succinil-CoA. A proteína Malato sintase A (outra enzima típica do ciclo glioxilato), codificada por VP0583, transforma o glioxilato e acetil-CoA em malato. O desvio do metabolismo de carbono para o ciclo glioxilato permite a produção de um produto de 4 carbonos a partir de duas moléculas de acetil-CoA (convertido a partir do acetato), com o gasto de apenas uma molécula de CO<sub>2</sub> (Kornberg, 1966; Ornston e Ornston, 1969). A atividade da isocitrato liase possibilita um desvio do caminho do ci-

clo TCA não necessitando de alguns intermediários, sendo, portanto um caminho bioquímico mais eficiente para o crescimento de células bacterianas e de outros organismos, principalmente em cultivos ricos em ácidos graxos. De modo geral, o ciclo do glioxilato é reprimido durante o cultivo em glicose e induzido durante o cultivo em acetato (Nimmo et al., 1987; Cozzone, 1998). No entanto, para *V. parahaemolyticus*, parece ocorrer o inverso. O cultivo na presença de NAG, onde se deduz ser rico em acetato intracelular, induz uma repressão da via do glioxilato. Isso indica um novo mecanismo regulatório das vias do ciclo TCA em *V. parahaemolyticus*, independente da concentração de acetato e que deve ser investigado com mais detalhes.

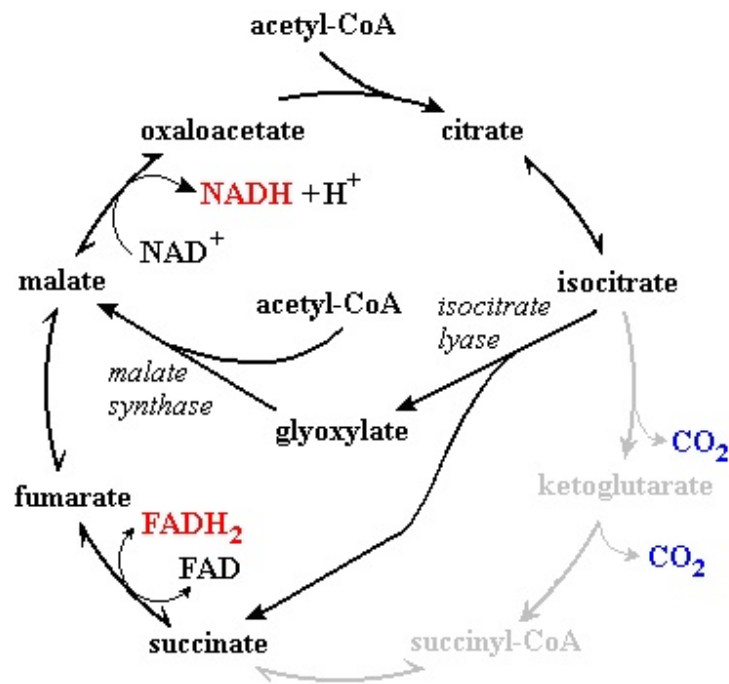


Figura 5.2: : Ciclo de Krebs ou TCA (ciclo do ácido tricarboxílico). O círculo indica a via completa do ciclo TCA descrita para maioria dos vegetais superiores e bactérias. A via do glioxolato está marcada em negrito, começando pela ação da isocitrato liase sobre o isocitrato quando o mesmo está com altas concentrações intracelulares

Outros dois possíveis operons parecem ter sido reprimidos por NAG. Eles são formados por VP0081, VP0082, VP0083 e VP0086, VP0087, VP0088, VP0089. A

maioria destes genes é de proteínas hipotéticas. Considerando a regulação destes genes em resposta ao tipo de fonte de carbono e energia utilizada, esta região gênica desperta o interesse para estudos aprofundados de função protéica e regulação gênica. Alguns genes com funções associadas com modificações pós-traducionais e endereçamento protéico também foram reprimidos por NAG. A proteína Protease DO é uma proteína deformadora que é codificada pelo gene VP0433 e possui as funções na degradação de proteínas intracelulares. Esta proteína é essencial para sobrevivência em altas temperaturas e é induzida em torno de duas vezes quando a bactéria chega à fase estacionária de cultivo (Seol et al., 1991; Swamy et al., 1983).

O gene VP0510, reprimido, codifica uma proteína DsbC de troca entre tiol:disulfeto que, junto com a proteína DsbA, são integrantes chave para a formação de pontes disulfeto em proteínas recém-formadas no periplasma (Zapun et al., 1995). Além disso, há o gene VP0535 que codifica a lipoproteína peptidase sinal, que é uma proteína de membrana envolvida no reconhecimento e remoção de peptídeos sinais de lipoproteínas para exportação (Mizushima et al., 1984). Já o gene VP1106 codifica para uma proteína LolA envolvida na localização e fixação da lipoproteína mais abundante Lpp da membrana externa (Matsuyama et al., 1997). Estes resultados sugerem que no início da utilização de NAG por *V. parahaemolyticus*, há uma repressão de mecanismos envolvidos com o envelhecimento e com a secreção protéica.

Ainda como reprimido alguns genes apareceram com bastante lógica. Os genes VPA0461, VPA1619, VPA1638 e VPA1641 codificam para proteínas envolvidas na degradação de amido, dextrina, maltose e outros polímeros da glicose formados por ligações glicosídicas. O gene VPA0461 que codifica a proteína alfa-amilase que é responsável por transformar amido ou glicogênio em Dextrina. Através da ação da  $\alpha$ -amilase extracelular (AmyE), algumas bactérias são capazes de hidrolisar amido, glicogênio e amilose em pequenas moléculas de maltodextrina (Ishikura et al., 1977; Park et al., 2009). Enquanto os genes VPA1638 e VPA1641 codificam para um precursor de pulunanase e uma amilase maltogênica.

Ambas atuam em um processo de degradação de glicogênio que envolve a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas pela pululanase com a liberação de um maltooligosacarídeos linear, que é hidrolisado em maltose e maltotriose pela amilase maltogênica (Park et al., 2009). Além disso, o gene VPA1619 codifica a proteína 4-alfa-glucanotransferase que é responsável pela transformação da Maltose em alfa-D-Glicose. A repressão destes genes no início da utilização de NAG por *V. parahaemolyticus* indica que a bactéria sofreu uma alteração fisiológica quanto à especificidade para captura de fontes de carbono. Está claro que, durante o cultivo em meio com maltose em abundância, *V. parahaemolyticus* aumentou a expressão de proteínas envolvidas na degradação de maltose ou de possíveis fontes maiores deste dissacarídeo no ambiente. Com o início da assimilação de NAG, algum mecanismo de regulação foi acionado para que esta maquinaria fosse reprimida.

### **5.5 Importância da N-acetilglicosamina para o crescimento do *V. parahaemolyticus***

As bactérias do gênero vibrio possuem um elevado índice de formação de colônias por possuírem mecanismos que permitem que elas consumam variadas fontes de carbono (Thompson et al., 2006) e entre estas fontes podemos citar a quitina, a maltose e a NAG. O NAG é o oligômero que compõe a quitina e está presente em muitos outros polímeros marinhos, sendo, conseqüentemente, um dos açúcares mais abundantes no ambiente marinho. Existe uma grande possibilidade de que o *V. parahaemolyticus* utilize o NAG como fonte de nutriente, já que ele permite o crescimento do organismo, indicando a alta versatilidade metabólica desta bactéria. Segundo estudos recentes, a ligação, assimilação e utilização de quitina, quitioligômeros e NAG são capazes de induzir mecanismos de regulação gênica que proporcionam alterações fisiológica em vibrios, tais como competência natural, melhoramento do *fitness* na formação de biofilme, na sobrevivência no ambiente e nos hospedeiros e na patogenicidade (Meibom et al., 2004; Santos, 2005; Meibom et al., 2005; Huq et al., 2005; Kirn et al., 2005; Reguera e Kolter,

2005).

A quitina tem uma forte influência no crescimento e na fisiologia dos vibrios. Foi estimado que a quitina suporte até 10% da produção de bactérias marinhas (Kirchman e White, 1999), e especula-se que a onipresença dos vibrios possa ser explicada através sua habilidade de se ligar e degradar a quitina presente no exoesqueleto de organismos marinhos (Riemann e Azam, 2002; Colwell et al., 2003). Neste estudo, os resultados indicam que o cultivo de *V. parahaemolyticus* na presença de NAG induz uma mudança fisiológica caracterizada inicialmente pela ativação de mecanismos catabólicos de NAG, o aumento da maquinaria de aderência e formação de biofilme e, possivelmente o surgimento de um perfil mais patogênico e mais suscetível à captação de fragmentos gênicos por competência natural.

# Capítulo 6

## Conclusões

Com base nas análises dos resultados apresentados durante esta dissertação, pode ser concluído que:

- A N-acetilglicosamina é utilizada por *V. parahaemolyticus* como fonte de carbono e energia;
- A assimilação e utilização de NAG por *V. parahaemolyticus* aciona mecanismos intracelulares de ativação e repressão da expressão de diversos genes que formam, portanto, um regulon *nag*;
- Há indícios de que N-acetilglicosamina pode ativar mecanismos de competência natural e de aderência e formação de biofilme em *V. parahaemolyticus* ;
- Os 34 genes hipotéticos ou hipotéticos conservados encontrados no experimento não são mais hipotéticos, mas sim genes reais com função desconhecida porem, regulados com presença de NAG e
- Existe a hipótese de que a regulação do *nag* do *V. parahaemolyticus* é parecido com o do *V. cholerae*.

## Referências Bibliográficas

- Y. Akeda, K. Nagayama, K. Yamamoto, e T. Honda. Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*. **The Journal of Infectious Diseases**, 176:822–824, 1997.
- Y. Akeda, K. Okayama, T. Kimura, R. Dryselius, T. Kodama, K. Oishi, T. Iida, e T. Honda. Identification and characterization of a type iii secretion-associated chaperone in the type iii secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus*. **FEMS Microbiology Letters**, 296:18 – 25, March 2009.
- A. O. Aliprantis, R. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, e A. Zychlinsky. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor. **Science**, 285:736 – 739, 1999.
- Juan Carlos Arguelles. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. **Arch Microbiol**, 174:217–224, 2000.
- B. Austin e D. A. Austin. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Springer, 1999.
- A. Ayar, N. Tug, H. Celik, M. Ozcan, e O. Ozcelik. Homocysteine-induced augmentation of spontaneous contraction of isolated guinea pig myometrium. **Polish journal of pharmacology**, 54:281–284, December 2002.
- M. M. Barnhart, J. Lynem, e M. R. Chapman. Glcnac-6p levels modulate the expression of curli fibers by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 188: 5212–5219, 2006.
- B. L. Bassler, P. J. Gibbons, C. Yu, e S. Roseman. Chitin utilization by marine



- bacteria. chemotaxis to chitin oligosaccharides by *V. furnissii*. **J. Biol. Chem.**, 266:24268–24275, 1991a.
- B. L. Bassler, P. J. Gibbons, C. Yu, e S. Roseman. Chitin utilization by marine bacteria. degradation and catabolism to chitin oligosaccharides by *V. furnissii*. **J. Biol. Chem.**, 266:24276–24286, 1991b.
- C. Beardsley, J. Pernthaler, W. Wosniok, e R. Amann. Are readily culturable bacteria in coastal north sea waters suppressed by selective grazing mortality? **Applied and Environmental Microbiology**, 69(5):2624–2630, May 2003.
- Y. Ben-Haim, F. L. Thompson, C. C. Thompson, M. C. Cnockaert, B. Hoste, J. Swings, e E. Rosenberg. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral pocillopora damicornis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53:309–315, 2003.
- M. Bentivoglio e P. Pacini. Flippo pacini: a determined observer. **Brain Research Bulletin**, 38:161–165, 1995.
- N. J. Bernhein e W. J. Dobrogosz. Amino sugar sensitivity in *E. coli* mutants unable to grow on n-acetylglucosamine. **J. Bacteriol**, 101:384–391, 1970.
- R. Bhowmick, A. Ghosal, e N.S. Chatterjee. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. [**J Appl Microbiol**, 103:97–108, 2007.
- C. L. Bouma e S. Roseman. Sugar transport by the marine chitinolytic bacterium *V. furnissii*, molecular cloning and analysis of the glucose and n-acetylglucosamine permeases. **J. Biol. Chem**, 271:33457–33467, 1996.
- B. K. Boutin, S. F. Townsend, P. V. Scarpino, e R. M. Twedt. Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits by immunofluorescence. **Applied and Environmental Microbiology**, 37:647–653, 1979.

- J. E Brower e J. H. Zar. **Field and Laboratory Methods for General Ecology**.  
Dubuque, Brown, 1977.
- L. Burklen, F. Schock, e M. K. Dahl. Molecular analysis of the interaction between  
the bacillus subtilis trehalose repressor trer and the tre operator. **Mol Gen  
Genet**, 60:48–55, 1988.
- K. R. Carman e F. C. Dobbs. Epibiotic microorganisms on copepods and other  
marine crustaceans. **Microscopy Research and Technique**, 37(2):116–135,  
June 1997.
- Alexandre Xavier Ywata Carvalho, Pedro Henrique Melo Albuquerque,  
Gilberto Rezende de Almeida Junior, e Rafael Dantas Guimarães. **Clusteri-  
zação Hierárquica Espacial**. IPEA, 2009.
- Marcos Catanho, Antonio Basílio de Miranda, e Wim Degrave. Comparando geno-  
mas: bancos de dados e ferramentas computacionais para a análise compara-  
tiva de genomas procarióticos. **SUPLEMENTO : BIOINFORMÁTICA E  
SAÚDE**, v.1, n.2,:335–358, 2007.
- Vivian G. Cheung, Michael Morley, Francisco Aguilar, Aldo Massimi, Raju Kucher-  
lapati, e Geoffrey Childs. Making and reading microarrays. **Nature Genetics  
Supplement**, 21:15–19, 1999.
- D. A. Chiavelli, J. W. Marsh, e R. K. Taylor. The mannose-sensitive hemag-  
glutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. **Applied and  
Environmental Microbiology**, 67:3220–3225, 2001.
- L. A. Chimetto, M. Brocchi, M. Gondo, C. C. Thompson, B. Gomez-Gil, e F. L.  
Thompson. Genomic diversity of vibrios associated with the brazilian coral  
mussismilia hispida and its sympatric zoanthids (palythoa caribaeorum, palythoa  
variabilis and zoanthus solanderi). **Journal of Applied Microbiology**, 106:  
1818–1826, 2008a.

- L. A. Chimetto, M. Brocchi, C. C. Thompson, H. R. Ramos R. C. R. Martins, e F. L. Thompson. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the brazilian coral *mussismilia hispida*. **Systematic and Applied Microbiology**, 31:312–319, 2008b.
- E. Chitlaru e S. Roseman. Molecular cloning and characterization of a novel beta-nacetyldglucosaminidase from *V. furnissii*. . **J. Biol. Chem**, 271:33433–33439, 1996.
- CMR. Manual do cmr. Manual do CMR.
- R. R. Colwell. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related vibrio species. **J Bacteriol**, 104(1):410–433, October 1970.
- [R. R. Colwell. Global climate and infectious disease the cholerae paradigm. **Science**, 274:2025–2031, 1996.
- R. R. Colwell e D. J. Grimes. **Nonculturable microorganisms in the environment**. American Society for Microbiology, 2000.
- R. R. Colwell, A. Huq, S. M. Islam, K. M. A. Aziz, M. Yunus, H. N. Khan, A. Mahmud, B. R. Sack, G. B. Nair, J. Chakraborty, D. A. Sack, e E. Russek-Cohen. Reduction of cholera in bangladeshi villages by simple filtration. **Proceedings of the National Academy of Sciences dos Estados Unidos da America**, 100:1051–1055, 2003.
- T. D. Connell, D. J. Metzger, J. Lynch, e J. P. Folster. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. **J Bacteriol**, 180:5591–600, 1998.
- A. J. Cozzone. Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 52:127–164, 1998.

- D. D. Dalma-Weiszhausz, J. Warrington, E. Y. Tanimoto, e C. G. Miyada. The affymetrix genechip platform: an overview. **Methods Enzymol.**, 410:3–28, 2006.
- A. DePaola, J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, e D. W. Cook. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in alabama oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, 69:1521–1526, 2003.
- W. J. Dobrogosz. N-acetylglucosamine assimilation in *Escherichia coli* and its relation to catabolite repression. **J Bacteriol**, 95:585–591, 1968.
- D. Emmeluth. Dr. don emmeluth. BIOL 1107.
- J. J. Farmer. **The family Vibrionaceae**. Springer, 1992.
- S. M. Faruque, M. J. Albert, e J. J. Mekalanos. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62(4):1301–1314, December 1998.
- T. Fujino, D. Okuno, S. Nakada, K. Oyama, T. M. Fukai, e T. Ueho. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. **Journal of Japanese Association Infection Diseases**, 35:299–304, 1953.
- E. Garay, A. Arnau, e C. Amaro. Incidence of *Vibrio cholerae* and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. **Appl Environ Microbiol**, 50:426–430, 1985.
- P. D. Gaspar e A. E. Santo. Curso de matlab universidade da beira interior. **Revista de Microbiologia**, 2002.
- Hugh G. Gauch. **Multivariate analysis in community ecology**. Cambridge Studies in Ecology, 1982.
- B. Gomez-Gil, L. Tron-Mayén, A. Roque, J. F. Turnbull, V. Inglis, e A. L. Guerra-Flores. Species of vibrio isolated from hepatopancreas, haemolymph and diges-

- tive tract of a population of healthy juvenile penaeus vannamei. **Aquaculture**, 163:1–9, April 1998.
- C. R. Hackney, E. G. Kleeman, B. Ray, e M. L. Speck. Adherence as a method of differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 40:652–658, 1980.
- M. Halpern, H. Gancz, M. Broza, e Y. Kashi. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease degrades chironomid egg masses. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(7):4200–4204, July 2003.
- E. Harth, L. Matsuda, C. Hernández, M. L. Rioseco, N. González-Escalona J. Romero, J. Martínez-Urtaza, e R. T. Espejo. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern chile. **Emerging Infectious Diseases**, 15(2):163–168, February 2009.
- J. F. Heidelberg, J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathavan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, e C. M. Fraser. Dna sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, 406:477–483, May 2000.
- J. F. Heidelberg, K. B. Heidelberg, e R. R. Colwell. Bacteria of the  $\gamma$ -subclass proteobacteria associated with zooplankton in chesapeake bay. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(11):5498–5507, November 2002a.
- J. F. Heidelberg, K. B. Heidelberg, e R. R. Colwell. Seasonality of chesapeake bay bacterioplankton species. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(11):5488–5497, November 2002b.

- M. Hirschfeld, C. J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J. H. Weis, R. M. Wooten, e J. J. Weis. Cutting edge: inflammatory signaling by borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. **J Immunol**, 163:2382–2386, 1999.
- E. Hofer. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no brasil, de infeccao gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, 14:174–175, 1983.
- R. P. Holmes e R. R. Russell. Mutations affecting amino sugar metabolism in *Escherichia coli* k-12. **J Bacteriol**, 111:290–291, 1972.
- T. Honda, Y Ni, e T. Miwatani. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of kanagawa phenomenon negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. **Infection and Immunity**, 56:961–965, 1988.
- S. Hondo, I. Goto, I. Minematsu, N. Ikeda, N. Asano, M. Ishibashi, Y. Kinoshita, N. Nishibuchi, T. Honda, e T. Miwatani. Gastroenteritis due to kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. **The Lancet**, 7:331–332, 1987.
- N. Howard-Jones. Robert koch and the cholera vibrio: a centenary. **British Medical Journal**, 288:379–381, 1984.
- Y. Hsieh, S. Liang, W. Tsai, Y. Chen, T. Liu, e C. Liang. Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, 71:3329–3336, 2003.
- A. Huq, R. B. Sack, A. Nizam, I. M. Longini, G. B. Nair, A. Ali, J. G. Morris Jr, M. N. Khan, A. K. Siddique, M. Yunus, M. J. Albert, D. A. Sack, e R. R. Colwell. Critical factors influencing the occurrence of vibrio cholerae in the environment of bangladesh. **Appl Environ Microbiol**, 71:4645–4654, 2005.
- T. Iida, K. Park, O. Suthienkul, J. Kozawa, Y. Yamaichi, K. Yamamoto, e

- T. Honda. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiology**, 144:2517–2523, 1998.
- K. Ishikura, Y. Nitta, e T. Watanabe. Hydrolysis of phenyl beta-maltoside catalyzed by saccharifying alpha-amylase from bacillus subtilis. **J Biochem**, 85: 1187–1192, 1977.
- K. Ishimaru, M. Akagawa-Matsushita, e K. Muroga. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*penaeus japonicus*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45:134–138, 1995.
- K. Izutsu, K. Kurokawa, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, T. Honda, e T. Iida. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. **Infect. Immun.**, 76(3):1016–1023, Mar 2008.
- C. A. Janeway e R. Medzhitov. Innate immunity: Lipoproteins take their toll on the host. **Current Biology**, 9:879–882, 1999.
- W. S. Jermyn e E. F. Boyd. Characterization of a novel *Vibrio pathogenicity* island (*vpi-2*) encoding neuraminidase (*nanh*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. **Microbiology**, 148:3681–3693, 2002.
- M. Kanehisa. A database for post-genome analysis. **Trends Genet**, 13:375–376, 1997.
- M. Kanehisa e S. Goto. Kegg: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, 28:27–30, 2000.
- M. Kanehisa, S. Goto, M. Hattori, K. F. Aoki-Kinoshita, M. Itoh, S. Kawashima, T. Katayama, M. Araki, e M. Hirakawa. From genomics to chemical genomics: new developments in kegg. **Nucleic Acids Research**, 34:354–357, 2006.

- T. Kaneko e R. R. Colwell. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. **Applied microbiology**, 29(2):269–274, 1975.
- M. T. Kelly e E. M. Stroh. Urease-positive, kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the pacific northwest. **Journal of Clinical Microbiology**, 27:2820–2822, 1989.
- N. O. Keyhani e S. Roseman. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic beta-n-acetylglucosaminidase. **J Biol Chem**, 271:33425–33432, 1996.
- N. O. Keyhani e S. Roseman. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochim Biophys Acta**, 1473:108–122, 1999.
- Y. R. Kim, S. E. Lee, C. M. Kim, S. Y. Kim, E. K. Shin, D. H. Shin, S. S. Chung, H. E. Choy, A. Progulsk-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield, e J. H. Rhee. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. **Infect Immun**, 71:5461–5471, 2003.
- Kirchman. **Microbial Ecology of the Oceans**. Wiley-Liss, 2000.
- D. L. Kirchman e J. White. Hydrolysis and mineralization of chitin in the delaware estuary. **Aquatic Microbial Ecology**, 18:187–196, 1999.
- T. J. Kirn, B. A. Jude, e R. K. Taylor. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. **Nature**, 438:863–863, 2005.
- T. Komada. *Vibrio parahaemolyticus* and the kanagawa phenomenon. **Clinical Nutrition**, 33:137–141, 1968.
- H. L. Kornberg. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. **Biochem J.**, 99:1–11, 1966.



- C. R. Lavilla-Pitogo, E. M. Leão, e M. G. Paner. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. **Aquaculture**, 164:337–349, 1998.
- D. V. Lightner e R. M. Redman. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, 164:201–220, 1998.
- David J. Lockhart, Helin Dong, Michael C. Byrne, Maximillian T. Follettie, Michael V. Gallo, Mark S. Chee, Michael Mittmann, Chunwei Wang, Michiko Kobayashi, Heidi Norton, e Eugene L. Brown. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, 14 (13):1675 – 1680, 1996.
- S. Mader. **Biology 8th Edition**. McGraw-Hill, 2004.
- M. Magalhães, V. Magalhães, M. G. Antas, e S. Tateno. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de humanos e de ostras no recife, brasil. **Revista de Microbiologia**, 22:83–88, 1991.
- M. Magalhães, Y. Takeda, V. Magalhães, e S. Tateno. Brazilian urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* carry genetic potential to produce the tdh-related hemolysin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 87:167–168, 1992.
- K. Makino, K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, e T. Iida. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. **The Lancet**, 361:743–749, 2003.
- The MathWorks. **Guia do Usuario do MATLAB**. The MathWorks, 2009a.
- The MathWorks. **Guia do Usuario do Toolboxes de Bioinformatica**. The MathWorks, 2009b.

- S. Matsuyama, N. Yokota, e H. Tokuda. A novel outer membrane lipoprotein, lolb (hemm), involved in the lola (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. **EMBO J**, 16:6947–6955, 1997.
- L. L. McCarter. Polar flagellar motility of the vibronaceae. **Microbiology and Molecular Biology**, 65:445–462, 2001.
- M. J. McFall-Nagai. Consequences of evolving with bacterial symbionts: insights from the squid-vibrio associations. **Annual Reviews, Inc.**, 30:235–256, 1999.
- K. L. Meibom, M. Blokesch, N. A. Dolganov, C. Wu, e G. K. Schoolnik. Chitin induces natural competence in vibrio cholerae. **Science**, 310:1824 – 1827, 2005.
- K. L. Meibom, X. B. Li, A. T. Nielsen, C. Y. Wu, S. Roseman, e G. K. Schoolnik. The vibrio cholerae chitin utilization program. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101:2524–2529, 2004.
- B. R. Merrell, R. I. Walker, e S. W. Joseph. In vitro and in vivo pathologic effects of *Vibrio parahaemolyticus* on human epithelial cells. **Canadian Journal Microbiology**, 30:381–388, 1984.
- D. S. Merrell, D. L. Hava, e A. Camilli. Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. **Mol Microbiol**, 43:1471–1491, 2002.
- K. Mizushima, K. Harada, e M. Namiki. Yag laser endoscopy: apparatus and technics. **Nippon Rinsho**, 42:2259–2264, 1984.
- J. R. Molenda, W. G. Johnson, M. Fishbein, B. Wentz, I. J. Mehlman, e T. A. Jr. Dadisman. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in maryland: Laboratory aspects. **Journal of Applied Bacteriology**, 24:444–448, 1972.
- J. F. Monsreal e J. J. F. Abuxapqui. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en productos marinos y en heces de manipuladores de alimentos. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, 30:223–227, 1988.

- R. A. A. Muzzarelli. Chitin and its derivatives new trends of applied research. **Carbohydrate Polymers**, 3:53–75, 1977.
- R. Naim, I. Yanagihara, T. Iida, e T. Honda. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in rat-1 cells from inside and outside of the cells. **FEMS Microbiology Letters**, 195:237–244, 2001.
- D. R. Nalin, V. Daya, A. Reid, M. M. Levine, e L. Cisneros. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. **Infect Immun**, 25:768–770, 1979.
- F. C. Neidhardt. Bacterial growth: constant obsession with  $dn/dt$ . **J. Bacteriol**, 181:7405–7408, 1999.
- H.G. Nimmo, A. C. Borthwick, E. M. el Mansi, W. H. Holms, C. MacKintosh, e G. A. Nimmo. Regulation of the enzymes at the branchpoint between the citric acid cycle and the glyoxylate bypass in *Escherichia coli*. **Biochem Soc Symp**, 54:93–101, 1987.
- M. Nishibuchi, A. Fasano, R. G. Russell, e J. B. Kaper. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. **Infection and Immunity**, 60:3539–3545, 1992.
- M. Nishibuchi, M. Ishibashi, Y. Takeda, e J. B. Kaper. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related dna sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrio species by the dna colony hybridization test. **Infection and Immunity**, 49:481–486, 1985.
- M. Nishibuchi e J. B. Kaper. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infection and Immunity**, 63:2093–2099, 1995.
- M. K. Nishiguchi. Temperature affects species distribution in symbiotic populations of *Vibrio spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, 66(8):3550–3555, August 2000.

- S. V. Nyholm, J. J. Stewart, E. G. Ruby, e M.J. McFallNgai. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. **Environ Microbiol**, 11:483–493, 2009.
- L. N. Ornston e M. K. Ornston. Regulation of glyoxylate metabolism in escherichia coli k-12. **J Bacteriol**, 98:1098–1108, 1969.
- A. P. A. Oxley, W. Shipton, L. Owens, e D. McKay. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *penaeus merguensis*. **Journal of Applied Microbiology**, 93(2):214–223, July 2002.
- S. Papadopoulou e H. M. Sealy-Lewis. The aspergillus niger *acua* and *acub* genes correspond to the *facA* and *facB* genes in aspergillus nidulans. **FEMS Microbiology Letters**, 178:35–37, 1999.
- C. Park, H. Kim, S. Kim, e C. Kim. Enzyme responsive nanocontainers with cyclodextrin gatekeepers and synergistic effects in release of guests. **J Am Chem Soc**, 131:16614–16615, 2009.
- J. K. Park, N. O. Keyhani, e S. Roseman. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. identification, molecular cloning, and characterization of a *n*, *n*'-diacetylchitobiose phosphorylase. **J Biol Chem**, 275:33077–33083, 2000.
- J. D. Peterson, L. A. Umayam, T. Dickinson, E. K. Hickey, e O. White. The comprehensive microbial resource. **Nucleic Acids Research**, 29:123–125, 2001.
- J. A. Plumbridge. Sequence of the *nagBacd* operon in *Escherichia coli* k12 and pattern of transcription within the *nag* regulon. **Mol Microbiol**, 3:505–515, 1989.
- J. A. Plumbridge. Induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* by *n*-acetylglucosamine and glucosamine: role of the cyclic amp-catabolite activator protein complex in expression of the regulon. **J Bacteriol**, 172:2728–2735, 1990.

- J. A. Plumbridge. Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the nagc repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the glmus operon and requires two separated nagc binding sites. **EMBO J**, 14:3958–3965, 1995.
- J. A. Plumbridge. Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by mlc regulation in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 33:260–273, 1999.
- J. A. Plumbridge. A mutation which affects both the specificity of ptsg sugar transport and the regulation of ptsg expression by mlc in *Escherichia coli*. **Microbiology**, 146:2655–2663, 2000.
- J. A. Plumbridge e A. Kolb. Cap and nag repressor binding to the regulatory regions of the nage-b and manx genes of *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 217:661–679, 1991.
- J. A. Plumbridge e A. Kolb. Dna loop formation between nag repressor molecules bound to its two operator sites is necessary for repression of the nag regulon of *Escherichia coli* in vivo. **Mol Microbiol**, 10:973–981, 1993.
- M. J. Pujalte, M. Ortigosa, M. C. Macián, e E. Garay. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to mediterranean oysters and seawater. **Internatl Microbiol**, 4:259–266, December 1999.
- F. Raimondi, J. P. Y. Kao, C. Fiorentini, A. Fabbri, G. Donelli, N. Gasparini, A. Rubino, e A. Fasano. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems. **Infection and Immunity**, 68:3180–3185, 2000.
- G. Reguera e R. Kolter. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. **J Bacteriol**, 187:3551–3555, 2005.

- L. Riemann e F. Azam. Widespread n-acetyl-d-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. **Appl Environ Microbiol**, 68: 5554–5562, 2002.
- D. Prazeres Rodriguez e E. Hofer. Vibrio species from the water-oyster ecosystem of sepetiba bay in rio de janeiro state brazil. **Revista de Microbiologia**, 17: 332–338, 1986.
- D. T. Rogers, E. Hiller, L.Mitsock, e E. Orr. Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Biological Chemistry**, 263:6051–6057, 1988.
- J. P. Rolls e C. W. Shuster. Amino sugar assimilation by *Escherichia coli*. [**J Bacteriol**, 112:894–902, 1972.
- D. S. Roseman e J. U. Baenziger. Molecular basis of lutropin recognition by the mannoseygalnac-4-so4 receptor. **PNAS**, 97:9949–9954, 2000.
- R. Sakazaki, K. Tamura, T. Kato, Y. Obara, e S. Yamai. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. enteropathogenicity. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, 21: 325–331, 1968.
- J. Sakurai, A. Matsuzaki, e T. Miwatani. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, 8:775–780, 1973.
- E. O. Santos. Indução de gens do regulon nag de v. cholerae el tor por n-acetilglicosamina. Dissertação de Mestardo, Departamento de genética, IB, UFRJ, 2005.
- T. Sawabe, Y. Oda, Y. Shiomi, e Y. Ezura. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. **Microbial Ecology**, 30: 193–202, 1995.

- T. Sawabe, N. Setoguchi, S. Inoue, R. Tanaka, M. Yoshimizu M. Ootsubo and, e Y. Ezura. Acetic acid production of vibrio haliotocoli from alginate: a possible role for establishment of abalone v. haliotocoli association. **Aquaculture**, 219: 671–679, April 2003.
- T. Sawabe, F. L. Thompson, J. Heyrman, M. Cnockaert, K. Hayashi, R. Tanaka, M. Yoshimizu, B. Hoste, J. Swings, e Y. Ezura. Fluorescent amplified fragment length polymorphism and repetitive extragenic palindrome-pcr fingerprinting reveal host-specific genetic diversity of vibrio haliotocoli-like strains isolated from the gut of japanese abalone. **Applied and Environmental Microbiology**, 68:4140–4144, 2002.
- J.H Seol, S. K. Woo, E. M. Jung, S. J. Yoo, C. S. Lee, K. J. Kim, K. Tanaka, A. Ichihara, D. B. Ha, e C. H. Chung. Protease do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: its identity with the htra gene product. **Biochem Biophys Res Commun**, 176:730–736, 1991.
- F. R. Sharp, H. Xu, L. Lit, W. Walker, M. Apperson, D. L. Gilbert, T. A. Glauser, B. Wong, A. Hershey D. Z. Liu, J. Pinter, X. Zhan, X. Liu, e R. Ran. The future of genomic profiling of neurological diseases using blood. **Arch Neurol**, 63:1529–1536, 2006.
- A. Shime-Hattori, T. Iida, M. Arita, K.S. Park, T. Kodama, e T. Honda. Two type iv pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. **FEMS Microbiol Lett**, 264:89–97, 2006.
- C. A. G. Soares. Tese de doutorado, pós-graduação de genética. Dissertação de Mestardo, Departamento de genética, IB, UFRJ, 2000.
- B. K. Sohanpal, S. El-Labany, M. Lahooti, J. A. Plumbridge, e I. C. Blomfield. Integrated regulatory responses of fimb to n-acetylneuraminic (sialic) acid and glcnac in *Escherichia coli* K-12. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101:16322–16327, 2004.

- O. Suthienkul, M. Ishibashi, T. Iida, N. Nettip, S. Supavej, e B. Eampoklap. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in thaila. **Journal of Infection Diseases**, 172:1405–1408, 1995.
- A. L. Svitil, S. Chadhain, J. A. Moore, e D. L. Kirchman. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. **Appl Environ Microbiol**, 63:408–413, 1997.
- K. H. Swamy, C. H. Chung, e A. L. Goldberg. Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits. **Arch Biochem Biophys**, 224:543–54, 1983.
- K. Tagomori, T. Iida, e T. Honda. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. **Journal of Bacteriology**, 184:4351–4358, 2002.
- O. Takeuchi, T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, e S. Akira. Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. **Int Immunol**, 13:933–940, 2001.
- C. C. Thompson, F. L. Thompson, e A. C. P. Vicente. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (mlsa). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58:617–621, 2008.
- F. L. Thompson, C. C. Thompson, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M. Gullian, e J. Swings. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53:1495–1501, 2003a.
- F. L. Thompson, C. C. Thompson, A. C. P. Vicente, G. N. D. Theophilo, E. Hofer, e J. Swings. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent am-



- plified fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(5):1946–1950, May 2003b.
- J. R. Thompson, M. A. Randa, L. A. Marcelino, A. Tomita-Mitchell, E. Lim, e M. F. Polz. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal vibrio community. **Applied and Environmental Microbiology**, 70:4103–4110, 2006.
- S. Tobisch, D. Zuhlke, J. Bernhardt, J. Stulke, e M. Hecker. Role of ccpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, 181:6996–7004, 1999.
- R. B. Todd, J. M. Kelly, M. A. Davis, e M. J. Hynes. Molecular characterization of mutants of the acetate regulatory gene *facB* of *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, 22:92–102, 1997.
- N. Verjan, I. Hirono, e T. Aoki. Genetic loci of major antigenic protein genes of *Edwardsiella tarda*. **Appl Environ Microbiol**, 71:5654–5658, 2005.
- A. P. Vogler e J. W. Lengeler. [analysis of the *nag* regulon from *Escherichia coli* K12 and *Klebsiella pneumoniae* and of its regulation. **Mol Gen Genet**, 219: 97–105, 1989.
- C. Wang e Q. M. Zhang. Hydrogen passivation of beryllium in p-type GaAs. **Phys. Rev. B**, 64:195–204, 2001.
- P. I. Watnick, K. J. Fullner, e R. Kolter. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* el tor. **J Bacteriol**, 181:3606–3609, 1999.
- R. J. White. Control of amino sugar metabolism in *Escherichia coli* and isolation of mutants unable to degrade amino sugars. **Biochem J**, 106:847–858, 1968.
- Y. Yamaichi, T. Iida, K. Park, K. Yamamoto, e T. Honda. Physical and genetic

- map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in vibrio species. **Molecular Microbiology**, 31:1513–1521, 1999.
- N. Yamano, N. Oura, J. Wang, e S. Fujishima. Cloning and sequencing of the genes for n-acetylglucosamine use that construct divergent operons (nage-nagac) from *Vibrio cholerae* non-o1. **Biosci Biotechnol Biochem**, 61:1349–1353, 1997.
- C. Yu, A. M. Lee, B. L. Bassler, e S. Roseman. Chitin utilization by marine bacteria. a physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. **J Biol Chem**, 266:24260–24267, 1991.
- A. Zaha, H. B. Ferreira, e L. M. P. Passaglia. **Biologia Molecular Básica**. Mercado Aberto, 2003.
- A. Zapun, D. Missiakas, S. Raina, e T. E. Creighton. Structural and functional characterization of dsbc, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, 34:5075–5089, 1995.
- D. Zhang, Z. Xu, W. Sun, e D. K. Karaolis. The vibrio pathogenicity island-encoded mop protein modulates the pathogenesis and reactogenicity of epidemic *vibrio cholerae*. **Infect Immun**, 71:510–515, 2003.

# Capítulo 7

## 7.1 Script MATLAB

```
1 [numericData, textData] = xlsread('arquivo.xls');
2
3
4 drugMechanism = textData(2:end,1); drugName = textData(2:end,2);
5
6 drug = strcat(drugMechanism,'-',drugName); cellLine =
7 textData(1,3:end); tumorTypes = strtok(cellLine,':');
8
9 missingVals = isnan(numericData); colMedians =
10 nanmedian(numericData); rowMedians = nanmedian(numericData,2);
11 rowMed = repmat(rowMedians,1,size(numericData,2));
12 numericData(missingVals) = rowMed(missingVals);
13
14 clustergram(numericData,'rowlabels',drug,'columnlabels',tumorTypes,...
15 colormap',jet','symmetricrange',false);
```

Figura 7.1: Script do MATLAB para gerar o dendograma.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)