

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pVCM04 EXTRAÍDO DE *Salmonella enterica*
ISOLADA DE CARÇAÇAS DE FRANGOS

ORIENTADOR: DR. LUIZ ARTUR MENDES BATAUS
DOUTORANDA: LÍLIAN CARLA CARNEIRO

Goiânia
Maio de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pVCM 04 EXTRAÍDO DE *Salmonella enterica*
ISOLADA DE CARCAÇAS DE FRANGOS

Tese apresentada ao curso de doutorado em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de doutor em Biologia. Área de Concentração: Biologia Celular e Biologia Molecular.

Goiânia, 2010

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao meu pai pela educação base para minha vida e apoio de fraterno amigo.

À minha avó pelo apoio e carinho de madrinha.

As minhas tias Eunice e Mirtes pelo apoio maternal e dedicação constante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus por sua orientação, dedicação, paciência e apoio ao longo desta jornada.

Aos meus amigos de laboratório: Marcela (de forma muito especial), Ana Flavia, Carol, Érika e Péricles.

Aos demais amigos de laboratório: Lays, Patrícia Ribeiro, Amanda Araújo, Raquel Silveira, Lorena Cintra; Eduardo Barbosa, Rogério Troian, Aline França e Flavio Marques; que sempre me incentivaram e me proporcionaram momentos de lazer, imprescindíveis ao bom andamento deste estudo e as nossas vidas pessoais, momentos os quais guardarei na lembrança e levarei comigo ao longo de minha vida

Às professoras Rosália e Fabrícia pela valorosa colaboração durante o curso.

Às amigas: Débora, Kelly e Nadya por suportarem as ausências em nossas amizades e apoiarem nos momentos difíceis.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta tese tornar-se realidade, o meu **MUITO OBRIGADA!**

SUMÁRIO	Páginas
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE QUADROS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	11
1.1- <i>Salmonella</i> sp	12
1.2- Salmonelose Aviária	12
1.3- Epidemiologia	14
1.4- Plasmídeos	16
1.5- Plasmídeos em <i>Salmonella</i> sp	18
1.6 - Replicação plasmidial	20
1.7 – Proteínas de mobilização	28
1.8- Conjugação	32
OBJETIVOS	35
2.1- GERAL	36
2.2- ESPECÍFICOS	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1- Cultivo dos microrganismos	38
3.2- Extração de DNA plasmidial	38
3.3- Eletroforese em gel de agarose	39
3.4- Digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição	39
3.5- Eluição do DNA no gel	39
3.6- Clonagem	40
3.7- Preparo e transformação de células competentes	40
3.8- Transformação de células <i>E. coli</i> por choque térmico	40
3.9- Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento do plasmídeo	41
3.10- Sequenciamento do plasmídeo	42
3.11- Análise das sequências	43

3.12- Comparação evolutiva das sequências protéicas do pVCM04	44
3.13- Estabilidade Plasmidial	44
3.14- Conjugação	44
3.15- Meios de cultura e reagentes	45 – 48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1- Seqüenciamento/Sequência nucleotídica do pVCM04	50
4.2- Sítios de restrição no pVCM04	52
4.3- Representação esquemática do pVCM04	53
4.4 – Análise de homologia das “ORFs” do pVCM04	55
4.5- Análise das ORFs 1 e 2	56
4.7- Análise da ORF3	58
4.8- Análise da ORF4	60
4.9- Análise da ORF5	62
4.10- Caracterização evolutiva plasmidial	63
4.11- Caracterização evolutiva das replicases e dos genes de mobilização	63
4.12- OriV no pVCM04	65
4.13- Motivos importantes no pVCM04	66
4.14- Análise da estabilidade plasmidial	68
4.15- Conjugação	69
CONCLUSÃO	71
PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	75
APÊNDICE	98 - 102

LISTA DE FIGURAS	Páginas
Figura 1- Esquema de replicação do tipo teta do pVCM04.	23
Figura 2- Demonstração da origem de replicação (OriC) do plasmídeo ColE1 presente em <i>Escherichia coli</i> .	25
Figura 3- Modelo da estrutura de ligação da RepA no DNA.	27
Figura 4 – Figura esquemática envolvendo as proteínas de replicação, mobilização e regulação da expressão do gene.	29
Figura 5- Sequência completa do pVCM04.	51
Figura 6- Representação esquemática do plasmídeo pVCM04.	54
Figura 7- Alinhamento entre proteína RepA do pVCM04 com RepA do pSM76 isolado de <i>Pasteurella multocida</i> e a replicase do plasmídeo presente em <i>Thiomonas intermédia</i> K12.	57
Figura 8- Alinhamento entre proteína RepB do pVCM04 e a RepB do pCCK647 de <i>Pasteurella multocida</i> e a replicase do plasmídeo pNC903 de <i>Rhodococcus ruber</i> .	58
Figura 9- Alinhamento entre proteína MobA do pVCM04 com a mobA do plasmídeo pAlvA de <i>Hafnia alvei</i> MISC230 e a MobA do plasmídeo pSW200 de <i>Erwinia stewartii</i> .	59
Figura 10- Análise de formação de hélice transmembranica para a proteína MobB do pVCM04.	60
Figura 11- Alinhamento entre proteína MobB do pVCM04 com MobB do plasmídeo pHE1 de <i>Halomonas elongata</i> e MobB do plasmídeo pAsa 13 de <i>Aeromonas salmonicida</i> .	61
Figura 12- Alinhamento entre proteína MobC do pVCM04 com MobC do pWQ799 e MobC do plasmídeo ColE1 de <i>Salmonella enterica</i> .	62
Figura 13A e 13B- Histograma das proteínas RepA e RepB deduzidas da sequência do pVCM04 e outras replicases depositadas no banco de dados..	64
Figura 14A; 14B e 14C- Histograma de homologia das proteínas MobA, MobB e MobC deduzida da sequência do pVCM04 e outras sequências protéicas de mobilização depositadas no banco de dados.	64
Figura 15- OriV do pVCM04. Em negrito está destacado a região de oriV e destacado de vermelho e sublinhado encontra-se o motivo de ligação da proteína DnaA.	66
Figura 16- Análise da estabilidade do plasmídeo pVCM04 em células de <i>E. coli</i> , através da comparação do número de células obtidas em meio sólido com e sem antibiótico.	68

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela I – Identificação dos possíveis genes, percentual de identidade e similaridade com genes depositados no <i>GenBank</i> .	55
Tabela II- Descrição dos motivos importantes encontrados no pVCM04.	66
Tabela III- <i>Codon usage</i> dos genes que compõe o pVCM04.	91

LISTA DE QUADRO

	Páginas
Quadro I – “Primers” utilizados na caracterização do pVCM04.	41
Quadro II – Sítios únicos de restrição importantes no pVCM04.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS		Páginas
Rep	Proteína replicase	11
OriC	Origem de replicação cromossomal	16
Plasmídeo R	Plasmídeo de resistência	16
APEC	“Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> ”	
IHF	“Integration Host Factor”	16
Mob	Proteína de mobilização	17
RC	Círculo rolante	20
OriV	Origem de replicação vegetativa	21
ZL	Zíper de leucina	24
OriT	Origem de transferência	26
Plasmídeo críptico	Plasmídeo desconhecido (a ser caracterizado)	28
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”	
	Ferramenta de pesquisa básica para alinhamento	33
NCBI	Centro Nacional para Informações Biotecnológicas	4
ORF	Seqüência de leitura contínua (“Open Read Frame”)	34
PCR	“Polymerase chain reaction”	
	Reação em cadeia da DNA Polimerase	34
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo	35
PROSITE	Programa de análise de proteínas	35
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético	37
Mobp	Proteína de mobilização (família relaxase)	53
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica	63
GTP	Guanosina trifosfato	63
ATP	Adenosina trifosfato	63

RESUMO

Um pequeno plasmídeo críptico isolado de *Salmonella enterica Enteritidis* denominado pVCM04 foi sequenciado e caracterizado. O pVCM04 é uma molécula circular com 3583 pb a qual não apresenta homologia com outros plasmídeos depositados no “GenBank”. 12 ORF (“Open Read Frame”) com mais de 50 aminoácidos foram preditas usando o programa ORFinder. A ORF1 e a ORF2 apresentaram homologia com proteínas de replicação de diferentes plasmídeos. As ORF 3, 4 e 5 apresentaram homologia com proteínas de mobilização presente em vários plasmídeos; as outras sete ORF não apresentaram homologia com genes depositados no “GenBank”. O pVCM04 possui uma região, com mais de 500 pb, que não está associada a nenhuma das proteínas preditas. Esta região está organizada em uma sequência rica em G+C, A+T e duas sequências repetidas diretas. A segunda sequência repetida direta contém uma sequência de ligação para a proteína DnaA (TTTACAC). Esta região está provavelmente associada com a origem de replicação do tipo theta. As relações filogenéticas para as proteínas deduzidas replicase e de mobilização mostraram maior similaridade para proteínas replicase do que para proteínas de mobilização. Experimentos de conjugação evidenciaram que a fusão pVCM04/pUC18 não possui uma boa capacidade de transferência; o teste de estabilidade plasmidial demonstrou que as células perdem 60% do pVCM04/pUC18 no primeiro dia de cultivo. A caracterização do pVCM04 sugere que este plasmídeo provavelmente seja um plasmídeo críptico oriundo de diferentes ancestrais.

Palavras - chaves: plasmídeo, *Salmonella enterica* e conjugação.

ABSTRACT

A small cryptic plasmid isolated from *Salmonella enterica* *Enteritidis* called pVCM04 was sequenced and characterized. pVCM04 is a 3583 pb circle molecule that showed no homology with other plasmids deposited in the GenBank. 12 ORF with more than 50 aminoacids were predicted using the ORF finder program. ORF1 and ORF2 showed homology with replication proteins of different plasmids. ORF 3-5 showed homology with mobilization proteins present in several plasmids; the others seven ORF showed no homology with genes deposited in GenBank. The pVCM04 possess a region with more than 500 pb that is not associated with none of the predicted proteins. This region is organized in a G+C rich, A+T rich and two repeat direct sequences. The second repeat direct sequence contains a region of DnaA box connection (TTTACAC). This region is probably associated to the replication origin theta type. The phylogenetic relationship among replicase and mobilization deduced protein showed highest similarity of replicase proteins than mobilization proteins. Conjugation experiments showed that the pVCM04/pUC18 fusion not have a good ability to transfer, the plasmid stability test showed that the cells lost 60% of pVCM04/pUC18 on the first day of cultivation. The characterization suggests that the pVCM04 probably would be a cryptic plasmid from fusion of different ancestral plasmid.

Key-words: plasmid, *Salmonella enterica* and conjugation

INTRODUÇÃO

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros, a sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes” (Cora Coralina).

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Salmonella* sp

O gênero *Salmonella* sp apresenta morfologia de bastonete Gram-negativo. Esse gênero é composto de bactérias móveis e aeróbicas facultativas. Não possuem capacidade de esporular e podem crescer entre 5°C e 47°C, tendo uma temperatura ótima a 37°C; cresce em pH entre 4,5 e 9,0. O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae (Varnan e Evans, 1991). A classificação atual, baseada em estudos de hibridização do DNA, divide a *Salmonella* em duas espécies: *S. enterica*, com 2.519 sorovares e *S. bongori* (Popoff *et al.*, 2004). Esse gênero fermenta a glicose e outros carboidratos com produção de ácidos e usualmente gás. Dentre as características bioquímicas, as salmonelas apresentam as provas de oxidase, indol e Voges-Proskauer negativas e apresentam positividade para as provas de catalase, sulfeto de hidrogênio, citrato de Simmons, lisina-ornitina e descarboxilase (Le Minor, 1984).

A *Salmonella* sp é sensível ao calor e pode ser facilmente destruída à temperatura de pasteurização (D'Aoust, 2000). Porém, é resistente a dessecação e ao congelamento, possuindo capacidade de sobreviver no ambiente por anos (Tortora, Funke e Case, 2005). Ela reside no trato intestinal e é eliminada nas fezes de animais e seres humanos infectados. Muitos alimentos, particularmente aqueles de origem animal e sujeitos à contaminação por esgoto doméstico, foram identificados como veículos para a transmissão desse patógeno. É um dos mais frequentes agentes causadores de salmonelose humana e um objeto de interesse epidemiológico particular (Gatto *et al.*, 2006). A Fiscalização da vigilância epidemiológica é necessária por causa da endemia da doença em determinadas áreas (Stanley, Goldsworthy e Threlfall, 1992).

1.2- Salmonelose Aviária

A salmonelose aviária é o termo que se designa a um grupo de doenças aviárias agudas ou crônicas, sendo causadas por um ou mais sorotipos do gênero *Salmonella* sp. Os quadros graves dessa doença implicam, na maioria das vezes, na eliminação dos lotes infectados, causando doenças como pulrose e tifo aviário (causadas respectivamente por sorotipos hospedeiro-específicos *S. pullorum* e *S. gallinarum*). A infecção paratífica é um

tipo de salmonelose aviária, cuja manifestação clínica é assintomática e determinada pelos mais de 2300 sorotipos do gênero, especialmente *S. enteritidis*, sendo o sorotipo responsável pelo maior número de surtos da enfermidade em humanos (Hoffer e Reis, 1994).

Segundo Veldman et al., (1995), as aves de criação industrial contaminam-se por *Salmonella* sp, via ovo, via ração, no seu ambiente de criação, roedores e outros animais. Pode ser introduzida horizontalmente em aves originadas de diferentes fontes, tais como: transmissão direta entre rebanhos (Sambrook, Fritsh e Maniats, 1989); alimentos contaminados (Davies et al., 1997); vetores biológicos como os insetos (Olsen e Hammack, 2000); roedores (Schlosser et al., 1999); pássaros selvagens (Craven et al., 2000) e humanos (Kinde et al., 1997). No comércio brasileiro, alimentos de origem animal são importantes fontes de contaminação, principalmente avícolas (carcaças de frango), podem ser encontrados na forma resfriada e congelada. O resfriamento não inviabiliza a presença de bactérias como as do gênero *Salmonella* sp (Forster e Mead, 1976).

Há estudos em que a *Salmonella* sp, isolada de alimentos, apresenta resistência a antibióticos. Tal resistência pode ser ocasionada pelo uso profilático terapêutico de antimicrobianos em alimentos produzidos por animais. Bactérias resistentes a antibióticos são encontradas em uma grande variedade de carne crua (Threlfall et al., 2000) e comida pré-preparada (Wang et al., 2006). Bactérias que colonizam intestinos animais poderão contaminar os produtos alimentícios embalados (Schroeder, White e Meng, 2004). Essas bactérias resistentes a antibióticos podem resultar da aquisição de genes externos advindos de outras bactérias resistentes ou pela combinação dos plasmídeos, transposons, bacteriófago ou transformação resultante de DNA do ambiente (Jain et al., 2003). Tais mutações podem disseminar resistência em bactérias patogênicas *in vivo* (que podem estar no intestino humano) (Tuohy et al., 2002) e *in vitro* (Perreten et al., 1997; Wang et al., 2006).

1.3- Epidemiologia

Estudos mostram que a ocorrência de *Salmonella* sp em carcaça de frango pode variar de 0,024% a 85%, sendo um veículo importante para a transmissão dessa bactéria (Fernandes et al., 2003). Levantamento em diversos países tem mostrado que 30% a 50% das carcaças de frango congeladas ou refrigeradas estão contaminadas por *Salmonella* sp (Silva, Santos e teixeira, 2004). No Brasil, há relatos de contaminação em frangos e seus derivados variando de 9,15% a 86,7% (Almeida et al., 2003). Devido à capacidade de resistência e multiplicação na presença de fármacos, as infecções causadas por *Salmonella* sp aumentaram rapidamente nos últimos dez anos. *S. typhimurium* é uma das principais responsáveis pelo alto número de infecções humanas de origem zoonótica, podendo ser considerada uma pandemia (Gatto et al., 2006).

Alimentos de origem animal, principalmente a carne de frango, representam papel fundamental na epidemiologia das Salmoneloses humanas, podendo tornar-se um problema potencial na determinação de quadros de infecção alimentar em seus consumidores (Carvalho e Cortez, 2005). Pesquisadores descrevem que acometimentos por salmonelose estão associados à carne avícola ou a ovos (Humphrey, Mead e Rowe, 1988; Mishu et al, 1994, Tauxe, 1991). Os animais e seus produtos, particularmente carne e ovos de galinha, são considerados fontes importantes de infecções (Rodrigue, Taux e Rowe, 1990). Por causa da importância da salmonelose causada por veiculação alimentar, muitos métodos foram descritos para localizar fontes de contaminação e elucidar a epidemiologia dessa infecção (Helmuth e Schroeter, 1994).

Um levantamento realizado pelo "Public Health Laboratory Service do Reino Unido" no período de 1992 a 1998, do total de 4012 surtos de doenças infecciosas intestinais ocorridas na Inglaterra e no País de Gales, *Salmonella* sp foi o mais frequente microorganismo encontrado, sendo responsável por 879 casos (22% dos casos) (Guard-Petter, 2001). Dados do "Food and Drug Administration" (FDA, 1992) dos Estados Unidos estima que 1/3 dos casos de doenças transmitidas por alimentos é devido a *Salmonella* sp; cerca de 2 a 4 milhões de casos anuais. Além dos problemas gerados em relação à saúde pública, o prejuízo econômico gerado pela salmonelose à economia norte americana é de cerca de 4 bilhões de dólares anuais (Mead et al., 1999). Entre 1995 e 2001, no Brasil,

Chile, Argentina, Peru, Uruguai, Paraguai e Equador foram relatados 406 surtos e 16.304 casos de Salmonelose. A *Salmonella* foi considerada o patógeno de maior importância epidemiológica (Franco, 2003).

As *Salmonellas* sp representam mundialmente cerca de 10% a 15% dos casos de gastroenterite aguda, sendo fontes comuns destes surtos alimentares, devido a ingestão de aves, ovos, carnes e derivados de carne. Apesar de no Brasil existirem iniciativas no sentido da elaboração de um sistema de informações sobre Salmonelose, são poucos os dados disponíveis (Jay, 2005). Segundo Hirsh (2003), a distribuição e persistência de *Salmonella* sp em granjas devem-se, principalmente, à existência de animais portadores assintomáticos, que eliminam de maneira contínua e variável a bactéria nas fezes. Essa excreção por animais aparentemente saudáveis está, em geral, associada a fatores estressantes como alterações bruscas da temperatura ambiental, privação de água e alimentos, superpopulação, mistura de animais de lotes diferentes, parto e o uso de antimicrobianos.

Segundo Piccolo et al., (1992) no Brasil, são escassos os dados epidemiológicos mostrando o problema das salmoneloses, uma vez que a notificação da intoxicação por alimentos contaminados não é obrigatória. No entanto, supõe-se que a ocorrência de *Salmonella* sp seja relevante devido às deficiências do saneamento básico e às más condições higiênico-sanitárias de grande parte da população, aliada ao precário controle de qualidade de algumas indústrias alimentícias (Fuzihara, Fernandes e Franco, 2000). Nas toxinfecções alimentares registradas tanto no Brasil quanto no exterior, os sorotipos de *Salmonella* sp isolados com maior frequência têm sido *enteritidis* e o *typhimurium* (Van Der Wolf et al., 2001).

Entre as principais medidas de prevenção ou de controle aplicáveis em programa sanitário para esta enfermidade, encontra-se a limpeza e a desinfecção (Borch, Nesbakken e Christensen, 1996). A presença de qualquer sorotipo de *Salmonella* em alimentos é motivo para classificá-los como impróprios para consumo, tanto no mercado nacional como internacional. Isto tem levado as indústrias de produtos de origem animal a implementarem estratégias de controle com a finalidade de garantir a segurança dos alimentos (Kich et al., 2005).

Guiney et al., (1995); Roudier, Fierer e Guiney, (1992) encontraram que sorotipos de *Salmonella*, não tifóide, associados com doença extra-intestinal, possuem plasmídeos que contêm genes de virulência (spvC), importantes para a indução de uma infecção sistêmica e letal. Os resultados de Fierer, et al., (1992) demonstraram que 76% das 79 amostras de *Salmonella* isoladas de sangue humano e 42% das 33 amostras de fezes humanas possuíam plasmídeos. Nos animais e em humanos as bactérias do gênero *Salmonella* são isoladas de infecções naturais sistêmicas com maior frequência do que em infecções entéricas. Segundo Fierer et al., (1993), a presença de plasmídeos indica que eles possuem um papel importante na patogenicidade de *Salmonella* sp não tifóide.

1.4- Plasmídeos

São elementos extracromossomais com capacidade de replicação autônoma, constituídos por uma molécula de DNA fita dupla circular. Por serem capazes de se auto-replicarem (possuem uma origem de replicação análoga à OriC cromossomal), os plasmídeos são também considerados replicons, que se multiplicam independentemente do DNA cromossomal. Ocorrem geralmente em bactérias e por vezes em organismos eucarióticos, como em *Saccharomyces cerevisiae* (Lewin, 2001; Tortora, Funke e Case, 2005). O tamanho dos plasmídeos pode variar de 1 a 200 kb, e a sequência nucleotídica da maioria tem pouca ou nenhuma homologia com o cromossomo da célula hospedeira. Em geral, plasmídeos pequenos estão presentes em várias cópias por célula (plasmídeos multicópia), enquanto que plasmídeos maiores estão frequentemente presentes numa única cópia. O número de cópias geralmente se mantém estável, isto é, em determinadas condições de crescimento da célula o número permanece constante de geração para geração, permitindo uma coexistência estável com seu hospedeiro e minimizando a carga metabólica (Solar e Espinhosa, 2000).

Os plasmídeos não são essenciais para a célula bacteriana, o que equivale a dizer que eles podem estar presentes ou ausentes em uma determinada célula, e sua ausência não implica na inviabilidade da mesma, pelo menos em certas condições. Uma vez ausentes, os plasmídeos só podem ser recuperados por infecção, o que vale dizer que tais elementos não podem ser formados novamente, portanto um plasmídeo só pode ser gerado de outro já

existente (Azevedo, 1998). As vantagens que alguns plasmídeos repassam aos seus hospedeiros são as mais variadas possíveis, desde a resistência a agentes microbianos, como os plasmídeos R, até a capacidade de metabolizar e obter energia de substratos que não podiam ser degradados a partir dos sistemas enzimáticos sintetizados pelo DNA genômico da bactéria. A utilização deste recurso conferirá assim capacidade ao microrganismo de se adaptar a condições adversas, garantindo seu sucesso evolutivo frente aos microrganismos que não adquiriram tais plasmídeos (Rychlik, Gregorova e Hradecka, 2006).

Os plasmídeos podem conferir, ainda, resistência para patógenos bacterianos encontrados em rações de animais complicando a terapia veterinária. Animais que servem como reservatórios e são resistentes a tais bactérias, que são patógenos humanos, podem ser uma ameaça para a saúde humana. Esse plasmídeo R transmissível, que codifica resistência a vários fármacos pode ter um significado comum para patógenos animais os quais podem adquirir genes de resistência ou transmitir para patógenos humanos (Barnes e Gross, 1997). Investiga-se que plasmídeos R podem ser transferidos de indústrias aviárias para humanos, sugerindo que linhagens APEC (“Avian pathogenic *Escherichia coli*”) e seus plasmídeos podem servir como reservatórios de genes de resistência para bactérias que afetam a saúde pública (Levy, Fitzgerald e Macone, 1976; Koh e Kok, 1984). Linhagens APEC são importantes e prevalecem como patógenos bacterianos de indústrias sendo frequentemente encontrados como agentes de múltipla resistência antimicrobiana (Lanz, kuhnert e Boerlin, 2003), incluindo ampicilina, tetraciclina, aminoglicosídeos, fluoquinolonas, compostos quaternários de amônia e metais pesados (Yang et al., 2004). Linhagens resistentes a múltiplos fármacos frequentemente carregam plasmídeos conjugativos (Caudry e Stanisich, 1979).

A ocorrência de bactérias, com resistência a antibióticos, presente em ração de animais é consequência do uso de produtos terapêuticos e profiláticos. Trabalhos desenvolvidos relatam que essas bactérias são largamente encontradas em grande variedade de alimentos originados de carnes cruas Threlfall, (2000) e White et al., (2002) e em alimentos previamente preparados (Wang et al., 2006). Elas são encontradas no intestino de animais e podem ser detectadas em produtos embalados e subsequentemente tornarão parte da flora intestinal dos consumidores. Entretanto, essas bactérias resistentes encontradas nos

alimentos podem ser as mesmas encontradas em humanos e em animais (comensais) ou das encontradas no meio ambiente (Schroeder, White e Meng, 2004). Podem ser originadas de bactérias susceptíveis, as quais podem sofrer mutações por adquirir genes externos de resistência. A aquisição pode ser por plasmídeo, por meio da conjugação ou transdução, transformando o DNA (Jain et al., 2003).

Em bactérias Gram negativas, novos genes de resistência são adquiridos com mais frequência por conjugação plasmidial (plasmídeo R). A transferência por conjugação de um plasmídeo, transposons e integrons permite um movimento simples de material genético de uma bactéria com resistência a antimicrobiano, para outra. A transposição de genes de resistência de um plasmídeo para o DNA cromossomal e a habilidade imediata de adquirir novos genes de resistência devido à presença de integrons, são processos de recombinação frequentes. Essa é uma das razões para o aparecimento de novas combinações de gene, inclusive a recombinação entre diferentes plasmídeos R (Guerra et al., 2002).

1.5- Plasmídeos em *Salmonella* sp

As células trabalham com economia máxima de energia, dessa forma, o hospedeiro irá manter este plasmídeo em seu interior se este lhe conferir uma vantagem seletiva especial. A maioria dos sorotipos de *S. enterica* não possui plasmídeos; porém, foram encontrados plasmídeos em sorotipos associados com infecções de humanos e animais (Rychlik, Gregorova e Hradecka, 2006). Desses sorotipos, oito deles são conhecidos por abrigar um plasmídeo de virulência específico possuindo entre 50 e 100 kb. A *Salmonella* sp pode conter simultaneamente plasmídeos de baixa massa molecular, abaixo de 20 kb, que são comumente de função desconhecida ou plasmídeos de alta massa molecular (entre 20 kb e 200 kb), os quais podem conferir resistência a antibióticos (Rychlik, Gregorova e Hradecka, 2006).

Analisando o perfil plasmidial de diferentes isolados de *S. enteritidis* (Rychlik et al., 1998), identificaram e caracterizaram, aproximadamente, 30 plasmídeos de baixa massa molecular (Rychlik et al., 2001). Suas funções biológicas são quase sempre avaliadas para esses pequenos plasmídeos presentes em *Salmonella*. Mundialmente alguns estudos mostram que isolados de *Salmonella* sp tiveram aumento emergencial de resistência a

múltiplos fármacos (Chiu et al., 2006). Um plasmídeo de baixa massa molecular carreando resistência a sulfonamidas foi descrito em *S. choleraesuis* (Haneda et al., 2004). Já foram descritos plasmídeos em *S. typhi* (Boyd et al., 2003) e a presença deles tem conferido patogenicidade para tais bactérias (Baker e Dougan, 2007). Os genes de resistência a antibiótico são frequentemente localizados em transposons. Podem também ser encontrados na forma de gene captura e agrupado a integrons e depois mobilizados para extensão de resistência entre outros organismos (Fluit, 2005).

Em *S. typhimurium* a resistência a antibiótico é dependente de integrons mais frequentemente associados a uma ilha genômica localizada no cromossomo da *Salmonella* sp, os integrons podem ser encontrados também no plasmídeo. Existem duas classes de integron: classe 1 representada por sequências repetidas diretas (IS) e classe 2 representada por sequências invertidas (IR). A classe 1 de integron que em *Salmonella* sp são largamente distribuídos, consiste em duas sequências conservadas, a região 50 Cs e 30 Cs, transportando o gene *int I* para a proteína integrase e o gene *sul I* de resistência a sulfonamida (Tosini et al., 1998; Guerra et al., 2002). Em *Salmonella* sp foi descrito plasmídeos que possuem genes de resistência e de virulência simultaneamente, essa associação tem relevância epidemiológica, pois um processo de recombinação com *Salmonella* prevê vantagens de sobrevivência em condições hostis e oportunidade para uma evolução de novas linhagens genéticas (Majtan, 2006).

Alguns plasmídeos são responsáveis pela fagoconversão, a qual permite a resistência da bactéria contra infecção pelo vírus. Por exemplo, o plasmídeo pOG670 de 54 kb, pertencente ao grupo de incompatibilidade X (IncX) presente na *S. enteritidis*, é capaz de fazer a conversão dos fagos dos tipos 1 e 4 para 6a, e do fago 8 para o do tipo 13 (Ridley et al., 1996). Em *S. abortus-equi* foi descrito um plasmídeo de 85 kb que codifica resistência para metais pesados tóxicos (cromo, arsênio, cádmio e mercúrio). Este plasmídeo foi também identificado por carrear genes para utilização do citrato e resistência para antibiótico β - lactâmico (Ghosh et al., 2000).

Em *S. typhi* D4, um plasmídeo presente em múltiplas cópias foi caracterizado codificando um sistema de modificação de restrição (RMS) (Miyahara, Ishiwata e Yoshida, 1997). Em *S. enteritidis* o plasmídeo pFM366 codifica um sistema de restrição não funcional (Ibanez e Rotger, 1993). Relatos da *S. enterica* sorotipo *typhimurium* demonstram que

poucos plasmídeos têm sido caracterizados em detalhes, essa dificuldade é determinada pela baixa qualidade do sequenciamento de DNA e por permanecer obscura a função biológica plasmidial (Bernardi e Bernardi, 1984; Astill, Manning e Heuzenroeder, 1993). Em sorotipos de *S. enterica* sorotipo *Borreve*, um plasmídeo foi identificado por codificar o antígeno O 54 importante por aumentar a capacidade de virulência (Keenleyside e Whitfield, 1995).

1.6 - Replicação plasmidial

A replicação inicia em uma região denominada de OriC, que é uma sequência de DNA em torno de 245 bp e atua como sítio de ligação para proteínas nomeadas DnaA, B e C. A ligação dessas proteínas promove a abertura da dupla hélice do DNA, um processo essencial para que as enzimas de replicação leiam a sequência de base; porém, antes que as enzimas DnaA, B e C atuem; assim, esse sistema tem as enzimas topoisomerase e DNA girase que são necessárias para relaxar a tensão na hélice. A forquilha formada pela separação das fitas de DNA que são estabilizadas abertas por uma proteína denominada SSB (“single-stranded binding”), e o DNA é desenrolado com a ajuda da DNA helicase. Uma vez que a hélice foi desenrolada, a DNA polimerase se liga de tal forma que permite que seja sintetizada uma nova cadeia de DNA complementar. No entanto, a polimerase só pode funcionar se tiver uma hidroxila livre no sentido 3'. Este grupo hidroxila é fornecido por um “primer” do RNA (que é complementar ao DNA) e possui cerca de 5 a 15 nucleotídeos. A síntese do “primer” é dirigida por uma RNA polimerase (chamada primase) que não necessita de uma hidroxila livre na região 3'. Em seguida, a replicação do DNA procede simultaneamente em ambas as vertentes (Reece, 2004).

Considerando a estrutura genética, os plasmídeos possuem regiões essenciais contendo genes ou locais envolvidos na replicação e controle da replicação. Os genes plasmidiais podem ter um importante papel para o hospedeiro. Alguns desses genes estão envolvidos em processos como transferência de plasmídeo entre bactérias, resistentes a antibióticos, a metais pesados, à radiação e à transferência de DNA para eucariotos superiores (Del Solar et al., 1998). Existem três mecanismos de replicação para plasmídeos circulares, nomeados replicação do tipo theta, replicação por deslocamento de fita e

replicação do tipo círculo rolante (RC). Pesquisas com plasmídeos indicam que a replicação do tipo theta é mais frequente em bactérias Gram negativas e a replicação pelo modo círculo rolante nas Gram positivas. A replicação por deslocamento da fita tem sido associada com plasmídeo oriundo do grupo IncQ (possuem o mesmo grupo de incompatibilidade para replicação) (Del Solar et al., 1998). Plasmídeos de baixa massa molecular podem ser classificados no grupo de replicação do tipo theta e a replicação do tipo círculo rolante (Gregorova et al., 2004).

Os plasmídeos contêm sequências e genes considerados essenciais. Uma das sequências é a origem de replicação (OriV), a qual é específica para cada tipo de replicação, pois muitos plasmídeos codificam uma proteína envolvida no início da replicação, usualmente denominada de Rep. Outra sequência está envolvida no controle da replicação do plasmídeo. A exigência de um plasmídeo que codifica um iniciador é refletida pela presença de um sítio iniciador semelhante à origem de replicação, onde acontece a interação da proteína em relação ao DNA (Del Solar et al., 1998). O início da replicação do DNA não ocorre em locais aleatórios em torno do genoma, mas inicia-se em pontos específicos chamados origens de replicação. Uma vez que a síntese de DNA tenha sido iniciada, duas forquilhas de replicação, estendendo-se em qualquer direção a partir da origem, permitem a replicação completa do genoma. Bactérias, como *E. coli*, têm uma única origem de replicação (chamada OriC) (Kornberg e Baker, 1992).

Os elementos de DNA requeridos para atividade da origem de replicação têm sido definidos e caracterizados extensivamente. A organização estrutural de origens de replicação prevê que o sítio de ligação da Rep está localizado em uma região do DNA potencialmente rica em sequências AT repetidas. Nesse processo de iniciação da replicação, a proteína iniciadora liga à origem e induz o rompimento da dupla fita de DNA. Evento subsequente é o aumento de DNA helicase na forquilha de replicação, acompanhado por fatores adicionais para iniciar a síntese de DNA (Kornberg e Baker, 1992).

Essa síntese de DNA pelo mecanismo theta inicia em uma das várias origens e pode replicar unidirecional ou bidirecionalmente. Essa replicação envolve a fita molde, síntese do “primer” de RNA e a síntese de um iniciador de DNA para extensão covalente do pRNA (“primer” de RNA). A síntese de DNA é contínua em uma das fitas e descontínua na outra

fita (Kelman e O'Donnell, 1995; Zavitz e Mariani, 1991). Por meio de eletromicroscopia, a replicação intermediária é vista como um Q típico (“theta”), quando clivada na região replicada, a molécula adquire o formato Y (“forquilha”). Este mecanismo de replicação também pode ser monitorado por uma eletroforese bidimensional. Essas análises fornecem informações sobre a natureza da replicação intermediária, direção da replicação, local de origem e término e grau de ligação entre a síntese contínua e a síntese da fita descontínua. Algumas exceções citam que plasmídeos, usando mecanismo de replicação do tipo theta, requerem uma proteína Rep iniciadora plasmidial e uma DNA polimerase I do hospedeiro, durante os estágios iniciais na síntese da fita simples descontínua (Del Solar et al., 1998). A figura 1, a seguir, está representando um esquema de replicação do tipo theta do pVCM04.

REPLICAÇÃO UNIDIRECIONAL E BIDIRECIONAL DE UMA MOLÉCULA CIRCULAR DE DNA

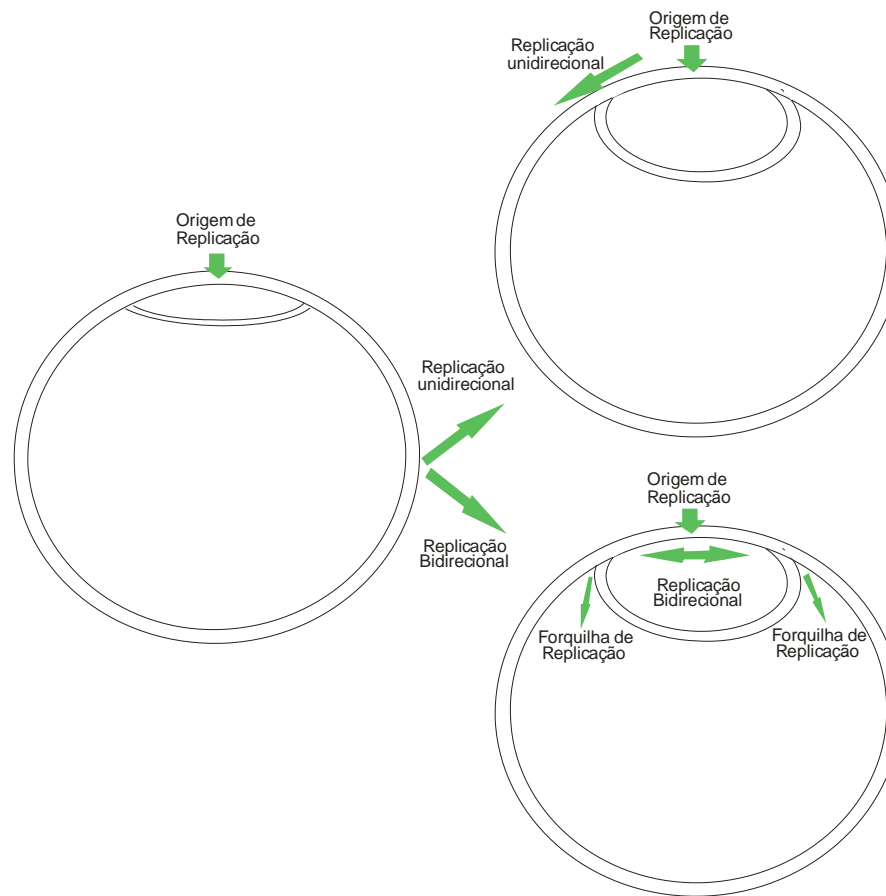


Figura 1- Esquema de replicação do tipo theta do pVCM04.

Em bactérias Gram negativas têm sido descritos plasmídeos do tipo ColE1 com replicação pelo mecanismo theta (Bernardi e Bernardi 1984; Mruk, Sektas e Kaczorowski, 2001; Fu et al., 1995). Plasmídeo de replicação círculo rolante tem sido encontrado em menor frequência em bactérias Gram negativas (Yasukawa et al., 1991), mas com maior frequência em bactérias Gram positivas (Khan, 1997).

A figura 2 a seguir esquematiza a OriC do plasmídeo ColE1 presente em *E. coli*.

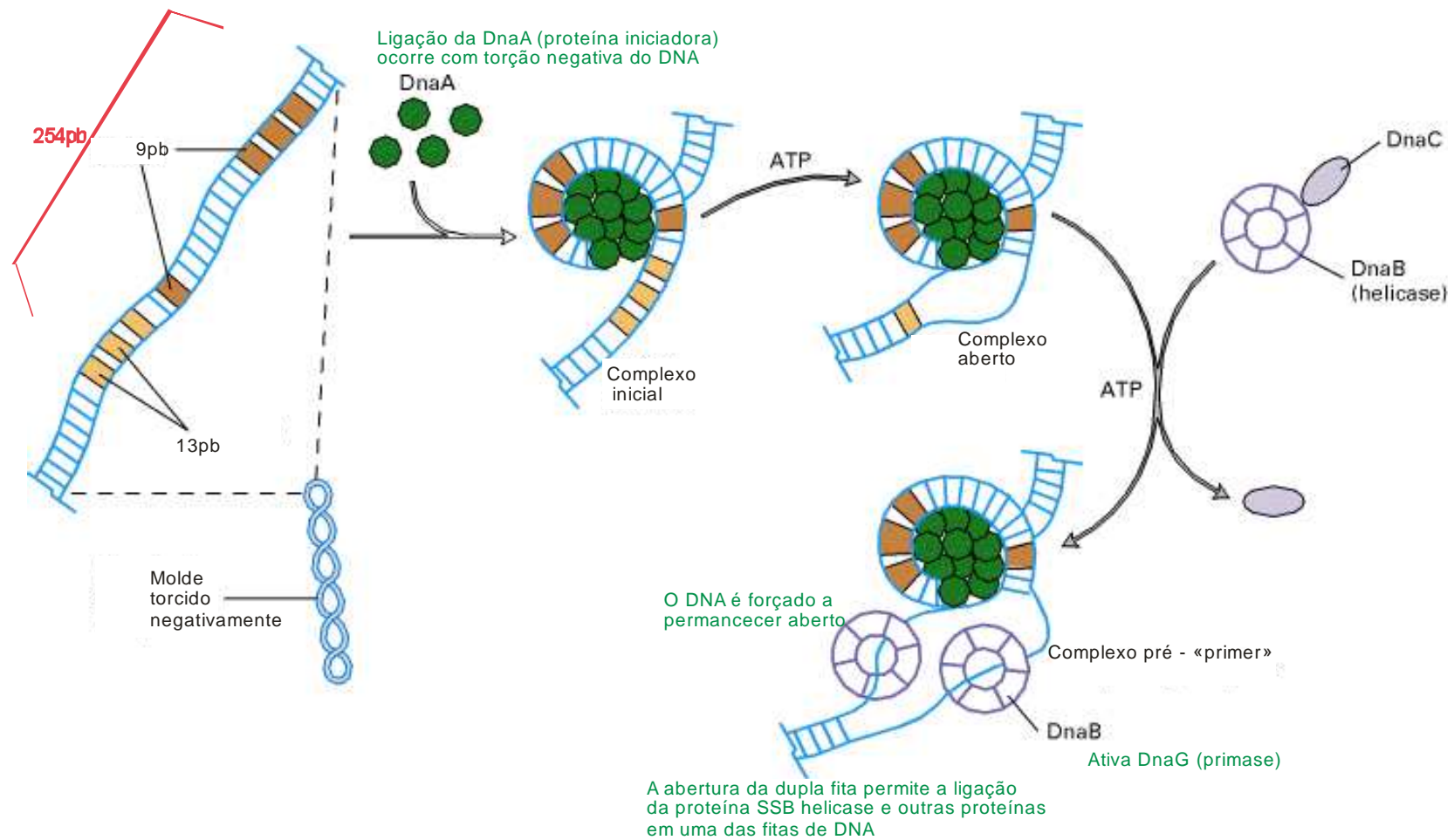


Figura 2- Demonstração da origem de replicação (OriC) do plasmídeo ColE1 presente em *E. coli*.

Fonte: Reece RJ. 2004. Analysis of genes and genomes. Cap.1, Structure and function. University of Manchester, UK. Editora Jonh Wiley & Sons Ltd. 4ª Edição.

Outro plasmídeo encontrado em *E. coli* é o ColE2, neste caso, a replicação *in vitro* começa em uma única origem e segue unidirecionalmente (Itoh e Horii, 1989). A proteína Rep do ColE2 sintetiza um “primer” único de RNA (ppApGpA) para se ligar na fita do DNA e indica a origem da replicação para a DNA polimerase I (Takechi Matsui e Itoh, 1995; Takechi e Itoh, 1995). Isso resulta na formação de uma estrutura - D (laço), sendo necessários vários fatores do hospedeiro para continuar a síntese do plasmídeo pela holoenzima DNA polimerase III (Watson, Vernet e Visentin, 1985).

A sequência nucleotídica das regiões de replicação de onze diferentes plasmídeos foram determinadas (Yasueda, Horii e Itoh, 1989). Todos estes plasmídeos possuem mecanismo de iniciação mediado pela proteína Rep, semelhante à Rep presente no plasmídeo ColE2. Entre esses onze, existem quatro diferentes grupos de especificidade de interação das proteínas Rep com as origens de replicação (Hiraga, sugiyama e Itoh, 1994). Foi proposto que a especificidade de interação das proteínas Rep com as origens de replicação dos quatro diferentes grupos de plasmídeos pode ser determinada pela combinação das sequências nucleotídicas e de aminoácidos localizados em três locais diferentes na porção C-terminal da origem de replicação (Shinohara e Itoh, 1996).

Em muitos casos, a origem de replicação contém sequências repetidas denominadas interons, as quais correspondem aos locais de ligação para a codificação da proteína Rep plasmidial. Interons são elementos fundamentais para o controle da replicação do plasmídeo (Chattoraj e Scheneider, 1997). São também numerosamente encontrados em plasmídeos de replicação do tipo theta como RK2 / RP4 (Pansegrau et al., 1995), pCU1 (Kozlowski et al., 1987) pSA (Tait, Kado e Rodriguez, 1983) e em plasmídeos pPS10 (Ferna'ndez-Tresguerres et al., 1995). As sequências de interons podem ser adjacentes ou separadas. Ao serem encontradas na região de origem tendem a ser repetidas em sequência, situados a uma distância que é, em geral, múltiplo de 11pb, ou seja, perto da periodicidade helicoidal da dupla hélice do DNA (Nieto et al., 1992).

A interação entre proteínas por meio do zíper de leucina (ZL) está presente em várias replicases plasmidiais, o ZL é responsável pela dimerização em várias proteínas de regulação presentes em eucariotos, através da formação de dupla fita enovelada (Landschultz, Johnson e Mcknight, 1988). O motivo para ZL tem sido detectado em várias regiões N-terminal de proteínas Rep de vários plasmídeos (Nieto et al., 1992). Análises

mostram a identificação de motivos para proteínas Rep nos plasmídeos, os quais estão envolvidos na interação com o ZL e em ligação com DNA (Veldman et al., 1995). Estudos recentes *in vitro* revelam que a proteína RepA de pPS10 possui dois domínios globulares, interagindo por uma ligação fraca, localizada na região C-terminal do ZL (Giraldo et al., 1989). Sequências alinhadas detalham uma organização estrutural similar para outras replicases plasmidiais presentes em replicação do tipo theta (Del Solar et al., 1998). A figura 3 representa os domínios da proteína RepA, esquematizando a forma de repressão e ativação da RepA (Giraldo et al., 1998).

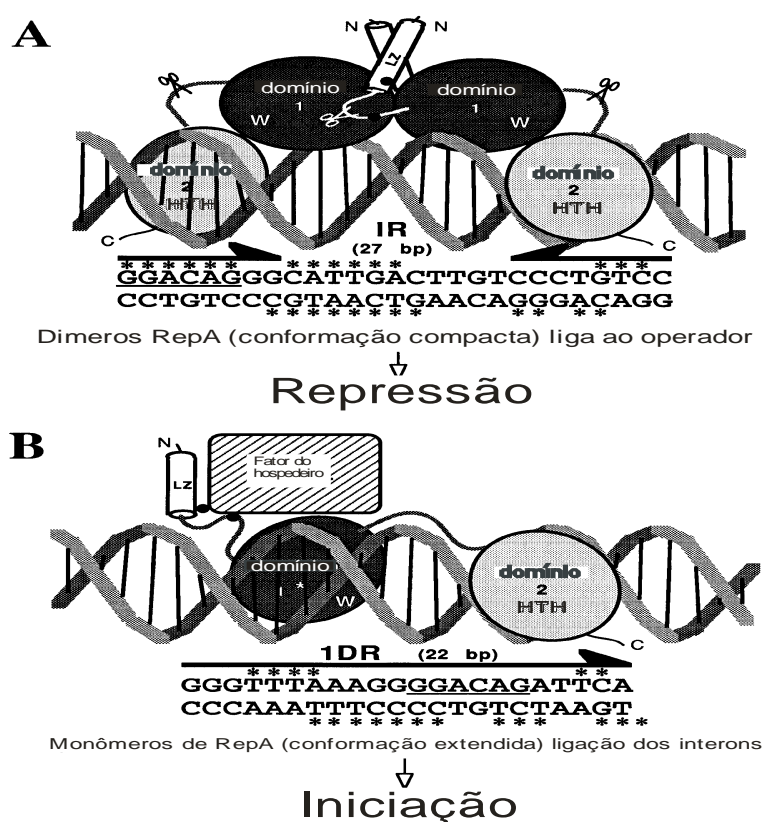


Figura 3- Modelo estrutura de ligação da RepA no DNA. A) Conformação compacta de dímeros da RepA que se ligam ao operador. B) Conformação estendida de monômeros da RepA que se ligam a interons (Giraldo et al., 1998).

Os plasmídeos de acordo com seu modo de replicação e manutenção em uma célula bacteriana são mais frequentemente classificados em grupos de incompatibilidade. Apenas

plasmídeos que apresentam diferentes modos de replicação podem residir na mesma célula bacteriana, enquanto dois diferentes plasmídeos, explorando a mesma maquinaria de replicação, são mutuamente incompatíveis e impossibilitados de permanecerem na mesma célula, por um período prolongado (Ou et al., 1990; Ou, 1993).

1.7 – Proteínas de mobilização

Foram testados genes de mobilização plasmidial (MobABCD) de três plasmídeos encontrados em *A. salmonicida*, os quais assemelham-se às proteínas do plasmídeo ColE1. Proteínas mobA são relaxases que cortam a dupla fita do DNA plasmidial em um sítio específico, *nic*, na origem da transferência (OriT). Uma tirosina ativa na posição Y25, outra tirosina na região (Y32) e três glutamatos podem estar envolvidos na segunda clivagem do DNA (Noirot-Gros, Bidnenko e Ehrlich, 1994). MobA torna-se covalentemente ligada ao DNA plasmidial e o complexo MobA-DNA se move através do ponto de ligação dentro da célula doadora (Zechner et al., 2000). MobB, C e D são proteínas acessórias que facilitam a ação da MobA. No plasmídeo ColE1, esses genes estão organizados em um operon; aparentemente mobC antecede mobA, enquanto mobB e mobD são codificadas na mesma sequência que mobA, mas em fases de leitura diferentes (Haake e Wang, 1997). Os detalhes funcionais das proteínas relaxases variam de plasmídeo para plasmídeo (Fu et al., 1991; Nelson et al., 1995). A figura 4 representa as proteínas de replicação e mobilização dos plasmídeos RSF1010/R1162/R300B (*E. coli*) (Meyer, 2009).

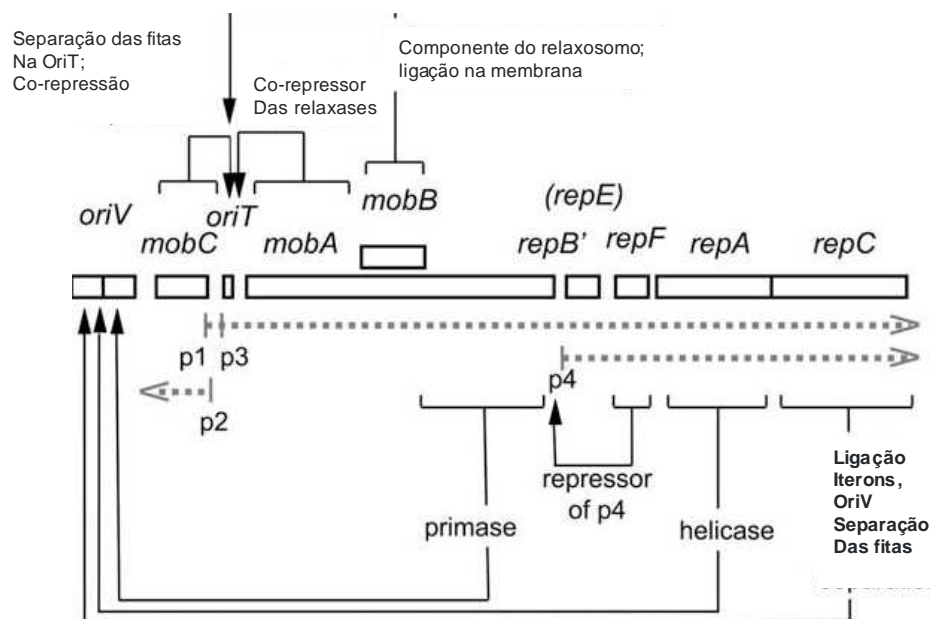


Figura 4- Figura esquemática envolvendo as proteínas de replicação do RSF1010/R1162/R300B, transferência e regulação da expressão do gene. Os transcritos são indicados por linhas pontilhadas horizontais, com p1-p4 correspondendo a promotores. A região funcional de cada proteína projetada o mapa genético indicado por colchetes.

As proteínas MobC de plasmídeos presentes em *Staphylococcus* sp são membros de uma família de proteínas com sítios associados a relaxases Mobp (Varsaki et al., 2009). Os genes mobC são encontrados diretamente ligados no gene mobA e codificam a proteína acessória necessária para as reações de transformação de DNA para formar o relaxossomo (Smith e Thomas, 2004). MobA é necessário para clivar o DNA, mas é incapaz de ligar na região OriT. Dessa forma, a proteína MobC se liga em sítios específicos na região OriT e desestabiliza a hélice de DNA, permitindo a proteína MobA interagir com sua sequência de reconhecimento (complexo MobC-OriT), que posteriormente é clivada (Caryl, Smith e Thomas, 2004; Caryl e Thomas, 2006). Estudos demonstraram que MobC do plasmídeo CloDF13 (*E. cloacae*) não permanece covalentemente ligada ao sítio do DNA. Após a clivagem, foi relatado que a molécula de DNA livre faz conjugação intermediária com um sistema de mobilização (Nunez e de La Cruz, 2001).

Muitos plasmídeos usam uma ou mais proteínas acessórias para separar a dupla fita de DNA. Por exemplo, o sítio de ligação plasmidial possui a proteína TraY, enquanto o

hospedeiro plasmidial possui a proteína IHF, ambas são requeridas como fator F da relaxase – é provável que essas proteínas reestruturem o DNA para ajudar na separação da dupla fita (Fu et al.,1991; Nelson et al., 1995). A origem de transferência contém sequências repetidas e invertidas originadas de um sítio rico em AT. A presença da sequência repetida e invertida em apenas uma das fitas não atrapalha o processo de transferência que ocorre normalmente (Kim e Meyer, 1989). O DNA adjacente à região repetida e invertida contém um sítio rico em AT, local onde se ligam as relaxases, porém, para a ligação é necessário que tenha havido o rompimento da dupla fita de DNA (Zhang e Meyer 1995). O início e o término da transferência normalmente requerem duas clivagens no DNA (Monzingo et al., 2007).

A sequência MobC plasmidial mostra grandes repetições invertidas e pequenas repetições diretas (Francia e Clewell, 2002). A proteína MobC do plasmídeo pKW1 encontrado em *Pseudomonas* sp contem sequências específicas para ligação da OriT, sendo regiões repetidas e invertidas do DNA (IR5 e IR6) e duas sequências repetidas diretas (DR1 e DR2), as quais podem estar envolvidas na mobilização ou na replicação do DNA plasmidial (Ciéslinski et al., 2008). Bhattacharjee, Rao e Meyer, (1992) realizaram análises de mobilização com plasmídeo recombinante, o qual contém duas sequências de OriT seguidas e repetidas localizada em torno de 10 pb que são exigidas para terminação da transferência. Essas sequências foram experimentalmente submetidas a mutações. As mutações introduzidas próximo a sequência repetida de 10 pb que foi determinada como sendo importante para formação de uma estrutura de "hairpin" (laço) – exigido para terminação do processo de transferência de DNA. A mutação demonstra que os 10 pb não estão presentes no processo inicial de transferência do DNA plasmidial.

De acordo com pesquisas realizadas por Perwez e Meyer (1999), a supressão de 54 aminoácidos presentes na composição da proteína MobB (MobBD1) diminui a frequência da transferência conjugativa do plasmídeo R1162 (*E. coli*), mas a mutação pode ser complementada quando MobB estiver no estado de ativação do tipo trans. Desse modo observamos que MobB no plasmídeo R1162 é importante não apenas para a estabilização do relaxossomo na OriT, mas também para a secreção da enzima na ausência da OriT. A supressão da MobBD2 reduz a transferência do plasmídeo R1162 numa frequência inferior

a 10 vezes. Os níveis normais de ambos os transportes e transferência são restaurados quando MobB está no estado trans.

A fase inicial do processo conjugativo para transferência de DNA plasmidial envolve o processamento de DNA, resultando na formação do complexo relaxossomo – uma proteína se liga e faz a intermediação com a fita simples do DNA plasmidial. A MobA é um componente chave do relaxossomo, sendo responsável pela reação de trans esterificação reversível da fita simples do plasmídeo. Essa proteína fica covalentemente ligada ao DNA, após a transferência do relaxossomo para uma célula receptora, e auxilia na recircularização do DNA transferido (Byrd e Matson, 1997).

MobA e outras relaxases de plasmídeos conjugativos não são muito semelhantes entre si, mas possuem três motivos localizados na região N-terminal. O motivo I inclui um resíduo de tirosina conservado, localizado nos últimos 50 aminoácidos, importante para manter a MobA covalentemente ligada ao DNA; o motivo II, que inclui uma serina localizada nos últimos 30 aminoácidos, tem a função de interagir com o DNA; e o motivo III contém três histidinas, (HHH) ou uma histidina, um glutamato e uma asparagina (HEN) (Varsaki et al., 2003). Ao observar a estrutura das proteínas de mobilização, fica claro que a proteína MobA contém um centro catalítico, com três histidinas ligadas a íons metálicos divalentes e à tirosina catalítica na proximidade da localização denominada como Y25 na proteína MobA, tendo como referência o plasmídeo R1162 (*E. coli*) (Monzingo et al., 2007).

A mobC em plasmídeos conjugativos pTEF1 e pAM373 (presentes em *enterococcus* sp) apresenta regiões conservadas (Coburn et al., 2007). Essa proteína é comum entre membros da família Enterobacteriaceae, incluindo as bactérias *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* respectivamente (Schubert et al., 2004). A análise do alinhamento das relaxases MobC1 e MobC2 revela regiões conservadas de assinatura (D-x6-17-ExE-(RL) -- x2-K-x3-R-YF). Para uma visão mais aprofundada sobre o mecanismo de ação de MobC relaxases, a região CloDF13 da proteína MobC do plasmídeo presente em *Enterobacter cloacae* e a região TraX_pAD1 da proteína MobC do plasmídeo de *Enterococcus faecalis* foram analisadas e introduziu-se mutagênese sítio dirigida em resíduos de aminoácidos conservados para TraX_pAD1 nas regiões: D152,

E170, E172, K176, R180 e Y181, revelando que elas são essenciais para a atividade de transferência (Francia et al., 2004).

Clewell (2007) isolou plasmídeos dos microrganismos de *E. faecalis* e *E. faecium* e destacou a importância da região TraX_pAD1, presente na MobC, a qual pode determinar resistência à antibióticos e difusão da virulência nestes dois microrganismos. Assim, percebe-se que há contribuição da proteína MobC para a transmissão de fatores de virulência (Lin et al. 2008).

1.8- Conjugação

Conjugação bacteriana é um processo de transferência de DNA que exige contato celular entre as células do doador e do receptor, após o contato celular há o envio de um sinal das bactérias doadoras formando uma ponte de transferência de DNA. A preparação da transferência do DNA inclui genes plasmidial da família relaxossoma e uma sequência OriT. A Transferência conjugativa geralmente é codificada por um plasmídeo de transferência que pode ser o plasmídeo grande que serve como auxiliar para pequenos plasmídeos presentes nas células bacterianas doadoras (Waters, 2001).

O mecanismo de transferência de DNA conjugativo parece ser notavelmente conservado em um largo espectro de plasmídeos presentes em bactérias Gram negativas e Gram positivas. As proteínas localizam-se em um sítio do DNA plasmidial e na origem de transferência (OriT), para formar um complexo chamado relaxossomo. O componente central deste complexo é denominado relaxase. O produto de traI é uma helicase, que corta uma das fitas de DNA na OriT e a desenrola a partir da sua extremidade 5'. Esta proteína cliva por meio de uma trans - esterificação reversível uma das fitas de DNA na OriT para gerar uma proteína covalente intermediária de DNA (Matson, Nelson e Morton, 1993).

In vitro, esse complexo proteína-DNA é duradouro (Becker e Meyer, 2002). A fita passa através do tubo de conjugação, para a célula receptora, ao mesmo tempo em que uma fita complementar daquela que fica na célula doadora é sintetizada para substituí-la. Uma fita complementar a que foi transferida para a célula receptora é também sintetizada, provavelmente de maneira descontínua, utilizando a própria maquinaria de replicação da célula hospedeira. Um mecanismo possivelmente envolvendo os produtos dos genes traY e traZ circulariza a molécula de DNA, até então linear. A tirosina é ligada na ponta 3' da

região OH no final da fita transferida. O produto do evento de conjugação complementar é a transferência do plasmídeo para uma célula receptora, com a retenção de uma cópia idêntica na célula doadora (Parker et al., 2005).

O processo de iniciação e terminação da transferência de DNA conjugativo na OriT R1162 (*E. coli*) foi extensivamente estudado, usando o pequeno plasmídeo móvel (RSF1010). A OriT R1162 consiste em um local específico do sítio de 10 pb invertido e repetido (Brasch e Meyer, 1987). Três proteínas (MobA, MobB e MobC), do plasmídeo R1162, formam na OriT um complexo proteína-DNA chamado relaxossoma (Scherzinger et al., 1992). Próximo a esta sequência há uma região rica em GC formando uma estrutura de “stem loop” (Inui et al., 2003). Furuya, Nisioka e Komano, (1991) descreveram a sequência nucleotídica que representa a OriT no plasmídeo R64 pertencente ao grupo IncII, são chamados de IncII os plasmídeos que possuem o mesmo grupo de incompatibilidade para replicação.

(CCCGAAAAACGGGACAGGATGTGCAATTGTAATACCGTCACACGCGACGCTA
TTACAATTGCCATCTGGGTCAGGGCTTCGCCCCGACACCCCGTAAGGAGCCTGAA
GTGAGTGATAGTGC GGTAAGAAAGAAAAGTGAGGT).

O processo de iniciação e terminação da OriT do DNA plasmidial de fertilização, de *E. coli*, também foi estudado; e a sequência correspondente à OriT do plasmídeo F está localizada dentro de um segmento de 250 pb, no final da região de transferência (Fu et al., 1991; Gao, Luo e Deonier, 1994). Esses 250 pb presente na OriT do plasmídeo F são requeridos por serem eficientes no processo de conjugação. Uma sequência de aproximadamente 100 pb possui uma região onde está localizado o sítio (IHF- “integration host factor”) e o sítio de ligação Tra Y. Os experimentos de mobilização com plasmídeo recombinante denotam duas sequências OriT repetidas “tandem” em várias linhagens plasmidiais. A sequência, de 100 pb eficiente na OriT, foi encontrada por ser essencial para o início da transferência de DNA. Entretanto, apenas uma porção de 36 pb desta sequência de transferência de 100 pb do plasmídeo de fertilidade foi encontrado no sítio de ligação das regiões correspondentes aos genes IHF, Tra Y (o produto desse gene é uma proteína de 16 kDa, a qual possui atividade semelhante a da helicase) e no sítio de ligação de Tra M. Esses genes são suficientes para o término da transferência do DNA (Gao, Luo e deonier, 1994).

Embora a conjugação seja definida como a transferência de DNA entre bactérias, é possível que qualquer tipo de célula possa servir como receptora, porque todos os eventos que ocorrem durante a conjugação são impulsionados pela célula doadora, e codificada por um plasmídeo (Waters, 2001).

OBJETIVOS

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós” (Marcel Prost).

2- OBJETIVOS

2.1- GERAL:

Sequenciar e caracterizar um plasmídeo críptico extraído de um isolado de *Salmonella* sp. Analisar a estabilidade desse plasmídeo críptico e estudar a capacidade de conjugação plasmidial.

2.2- ESPECÍFICOS:

- 1 Sequenciar o plasmídeo críptico;
- 2 Analisar perfil de restrição para possíveis sítios de clonagem;
- 3 Analisar a estabilidade do plasmídeo pVCM04/pUC18 em *E. coli* DH5 α ;
- 4 Caracterizar sequências de genes que codificam prováveis ORFs;
- 5 Estudar a conjugação do pVCM04 presente na *E. coli* DH5 α para *E. coli* HB101.

MATERIAL E MÉTODOS

“A sabedoria é uma construção sólida e única, na qual cada parte tem seu lugar e deixa sua marca” (Michel de Montaigne).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

3.1 - Cultivo dos microrganismos

As amostras de *S. enterica* utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas de um abatedouro avícola (Mendes, 2008). Os isolados que albergavam plasmídeos de interesse foram selecionados e mantidos em laboratório no meio Lúria – Ágar, à temperatura de 4° C, sendo repicados mensalmente.

3.2 - Extração de DNA plasmidial

Baseado no manual do kit de extração FLEXIPREP da Pharmacia ®, foi inoculado 1 clone da bactéria *Salmonella* sp contendo o plasmídeo de interesse em 5 mL de meio LB e incubadas à 37°C por 24 horas sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL foi centrifugada a 5.000xg em tubos de plástico de 1,5 mL por 30 segundos, o processo foi repetido três vezes.

O sedimento foi ressuspensão em 200 µL de solução I (material e métodos, item 3.16.6.1), homogenizado e adicionados 200 µL de solução II (material e métodos, item 3.16.6.2). O material foi misturado por inversão do tubo durante 5 minutos e adicionados 200 µL de solução III (material e métodos, item 3.16.6.3), homogenizado suavemente por inversão durante 5 minutos e centrifugado a 5.000 xg por 5 minutos (segundo instruções do fabricante).

O sedimento, correspondente ao DNA cromossomal foi descartado e o sobrenadante, contendo o DNA plasmidial foi transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 420 µL de isopropanol e após homogenizado no vortex e colocado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 xg, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado deixado secar à temperatura ambiente.

O precipitado foi ressuspensão em 50 µL de água destilada estéril, visualizado em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio e analisado por eletroforese.

3.3- Eletroforese em gel de agarose

De acordo com Sambrook, Fritsh e Maniats, (1989) as amostras de DNA plasmidiais foram analisadas em gel de agarose. O DNA plasmidial foi avaliado em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo, dissolvida em TEB 0,5X e brometo de etídeo (0,2 µg/mL). Submeteu-se o gel a uma amperagem de 30 mA até que a amostra penetrasse, sendo posteriormente ajustada para 60 mA. Visualizaram-se as bandas de DNA plasmidial por irradiação ultravioleta de baixa intensidade.

3.4- Digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição

Foi utilizada a enzima *Eco* R1 na temperatura de 37° C, por um período de três horas, para digerir os plasmídeos pUC18 e pVCM04. O pUC18 sofreu digestão para ser linearizado e permitir clonagem de fragmentos do plasmídeo críptico pVCM04. O plasmídeo pVCM04 foi digerido com *Eco* R1 para produzir fragmentos menores e estes serem clonados no pUC18 e iniciar o sequenciamento.

Após digestão, o sistema foi colocado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e submetidos à eletroforese para confirmar a linearização dos respectivos plasmídeos.

3.5- Eluição do DNA no gel

Após os produtos da digestão plasmidial serem analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, foi realizada a eluição dos fragmentos de interesse. A região do gel contendo o fragmento alvo foi cortada e utilizou-se o marcador da Promega de massa molecular de 1 kb como parâmetro de comparação. O fragmento retirado do gel contendo o gene de DNA de interesse foi transferido para um tubo de plástico de 1,5 mL e, assim, determina-se a massa. A eluição do fragmento do gel de agarose foi processada conforme orientações do fabricante do kit de purificação Sephaglas Band Prep da Pharmacia (segundo instruções do fabricante).

Para cada 250 mg de gel foi adicionado 250 µl de solução solubilizadora e 5 µl de ácido acético 50% (v/v), e incubou por 5 minutos a 60 °C. Após resfriamento acrescentou-se 5 µl de solução de Sephaglas FP e incubou por 5 minutos. O material foi centrifugado e o sedimento foi lavado com a solução apropriada. O material foi eluído em 30 µl de água

milli Q e quantificado por meio de gel de agarose 1% (p/v) em lâmina.

3.6- Clonagem

Foi realizado sistema de clonagem envolvendo os plasmídeos pUC18 e pVCM04, com fragmentos plasmidiais de interesse. Os sistemas de ligação foram realizados previamente para clonagem dos genes digeridos e preparados no sistema Ready – TOGO T4 DNA ligase da Pharmacia. Após procedimentos de ligação, foram incubados a 16 °C por 18 horas. A concentração de DNA utilizada nos sistemas tinha uma razão molar (vetor: inserto) de 1:3.

3.7- Preparo de células competentes

O método utilizado foi o descrito por Inoue, Nojima e okayama, (1990). Uma colônia de *E. coli* DH5 α foi crescida em 5 mL de meio LB, a 37°C sob agitação de 150 rpm por 18 horas; 1 mL dessa cultura foi inoculada em 250 mL de meio SOB em um frasco de 1000 mL e incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm até atingir a D.O. de 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. O frasco foi então retirado do agitador e levado a um banho de gelo, onde se procedeu ao resfriamento da cultura por 10 minutos. As células foram, em seguida, coletadas por centrifugação a 2500 g a 4°C por 10 minutos e ressuspensas, cuidadosamente, em 20 mL de tampão TB a 4°C. Foi adicionado DMSO em uma concentração final de 7% e a cultura foi deixada no gelo por mais 10 minutos. Após esse período, a cultura foi alíquotada em quantidades de 200 μ L, congelada em nitrogênio líquido e estocada a - 80°C, até o momento do uso.

3.8- Transformação de células *E. coli* por choque térmico

A transformação de células competentes *E. coli* foi realizada pelos métodos descritos por Sambrook, Fritsh e Maniats, (1989), com modificações. Para transformação, as bactérias foram retiradas do freezer - 80°C e deixadas no gelo por 10 minutos. Em um microtubo, foram adicionados 100 μ l de células competentes, 3,5 μ l do sistema de ligação e 22,5 μ l de MgCl₂ 5,0 mM/Tris-HCl pH 7,4. Após agitação bem suave, o tubo foi mantido no gelo por 30 minutos e aplicou-se choque térmico por 5 minutos a 37°C e, logo em seguida, a 42°C por 3 minutos. O sistema foi imediatamente colocado no gelo e adicionou-

se 200 µl de meio LB. Para a recuperação das células transformadas, o sistema foi incubado sob lenta agitação a 37°C por 1 hora. Após este período, semeou-se o sistema em placas de petri contendo LB com ampicilina a 100 µg/mL, 5 mM de IPTG e 1,5 µg/mL de X-gal. Essas placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

3.9- Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento do plasmídeo

Foram utilizados “primers” universais "Forward" e "Reverse" do pUC18 para obter o primeiro fragmento do pVCM04 e baseado na sequência obtida foram construídos “primers” específicos do pVCM04. Os “primers”, a sequência e a temperatura de anelamento estão resumidos no quadro I.

Quadro I- “Primers” utilizados na caracterização do pVCM04

““primer””	Sequência (5’→3’)	Temperatura de anelamento
"Forward" do pUC18	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	60°C
"Reverse" do pUC18	TGCAGCACTGACCCT	60°C
LC01	GACAGCGAGGGAAGCCG	60°C
LC02	CGGACGACTGGGAAATGG	60°C
LC03	GCCCCCTTTCATACCCG	60°C
LC04	CGCCCCGAAACCCCC	60°C
LC05	GCTGCTTCAATTTTCT	60°C
LC06	GCCAGCACACAGAGACCCC	66°C
LC07	CAGTTCCACACGCCCC	56°C
LC08	GCACCATCAGGCG	53°C
LC09	CGTCCGAACACAGCG	66°C
LC10	CGGCACCAACGCACTCG	60,1C
LC11	CCAGCACACACAGAGACC	55,7°C
LC12	CCTCTCCGTTTCCAATTCC	55,2°C

Após obtenção dos dois primeiros fragmentos, foram desenhados “primers” específicos para o pVCM04 e começou a ser realizada metodologia de “primers walking”; a medida que novos fragmentos eram obtidos, utilizava-se a nova sequência nucleotídica para desenhar novos “primers” e dessa forma sequenciar todo o pVCM04.

3.10- Sequenciamento do plasmídeo

As reações de sequenciamento seguiram o seguinte protocolo: 2 µL do produto de PCR ou DNA plasmidial, 1µL do “primer” a 2,5 pM, 2 µL de tampão "save money" (Tris-HCl 1 M pH 9,0 (2 mL); MgCl₂ 50 mM (1 mL); água bidestilada 10 mL), 1 µL do kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Pharmacia Biotech, EUA). O sequenciamento foi realizado em termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems) e pelo sequenciador de DNA “MegaBace analysis system 1000”, seguindo o programa: 35 ciclos de 96⁰C durante 1 minuto e 60⁰C por 1 minuto.

A etapa de precipitação do DNA ocorreu da seguinte maneira: 40 µL de isopropanol a 65% foram adicionados aos 10 µL de reação. A mistura foi homogeneizada no vortex por 30 segundos. Deixou-se que a precipitação ocorresse à temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 1000 rpm (força de centrifugação relativa) por 45 minutos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado, foram adicionados 250 µL de etanol 60%, para lavagem do material, e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O processo de lavagem com álcool foi repetido utilizando 100 µL do mesmo e, o sobrenadante, descartado. A placa contendo as amostras foi centrifugada de maneira invertida a 500 rpm por um minuto para garantir que todo o álcool fosse retirado da mesma. Uma secagem complementar foi realizada, deixando-se a placa por aproximadamente 10 minutos na capela de fluxo laminar. Este material foi ressuspenso em 10 µL de formamida, desnaturado a 95⁰C por cinco minutos e levado ao sequenciador.

3.11- Análise das sequências

A qualidade das sequências obtidas foi analisada utilizando-se os programas: Phred e CAP3 do site de bioinformática da Universidade Católica de Brasília (<http://www.bioinformática.ucb.br/electro.html>).

Após esta primeira análise, as sequências foram analisadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo programa BLAST ("Open Read Frame") o qual encontra regiões em que há similaridades entre as sequências (Ye et al., 2007, Altschul, Madden e Schaffer, 1997). O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com aquelas já depositadas em seu banco de dados e calcula a significância estatística dos resultados.

Posteriormente, utilizou-se o programa ORF Finder ("Open Read Frame"), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), que é uma ferramenta de análise gráfica que encontra todas as séries de leitura contínua de um tamanho mínimo, previamente selecionado, na sequência obtida pelo pesquisador ou em uma que já faz parte do banco de dados do NCBI (Wheeler et al., 2006). A provável sequência de aminoácidos obtida foi avaliada utilizando o programa BLAST.

As supostas proteínas obtidas foram analisadas também no banco de dados de domínios conservados para a classificação de proteínas (CDD) (Marchler e Bauer et al., 2009), uma parte do NCBI interligada a outros bancos de dados que identifica os domínios conservados das novas proteínas pesquisadas.

Para a análise protéica foi utilizado também o PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite>) programa de computador utilizado para prever os sítios de localização de algumas proteínas do plasmídeo (Falquet et al., 2002).

Outra ferramenta utilizada para análise das sequências obtidas foi o software Clustal X (Thompson et al., 1997), um programa de alinhamento de múltiplas sequências, que pode ser utilizado para avaliar sequência de proteínas ou nucleotídeos. Primeiro ele realiza um alinhamento por pareamento de todas as sequências a partir de todos os pareamentos possíveis que podem ser obtidos de um conjunto de sequências obtidas pelo pesquisador. Um guia das sequências pode ser construído de acordo com a similaridade entre o pareamento das sequências. Por fim, um alinhamento das múltiplas sequências é construído pelo pareamento das sequências na ordem correta definida pelo guia.

3.12- Comparação evolutiva das sequências protéicas do pVCM04

As sequências foram alinhadas com proteínas homólogas não redundantes obtidas a partir do Banco de dados “*GenBank*”. Foram escolhidas sequências onde os valores de probabilidade eram abaixo de ($Evalue^{-22}$). Relações filogenéticas das proteínas do pVCM04 e proteínas relacionadas foram realizadas de forma inequívoca alinhando 11 resíduos completos de aminoácidos de cada uma das proteínas RepA, RepB, MobA, MobB e MobC; disponíveis no banco de dados NCBI. Árvores filogenéticas foram construídas através do programa Neighbour-joining, método desenvolvido por Saitou e Nei (1987). Uma posterior análise de bootstrap foi realizada para testar a confiabilidade da árvore (Felsenstein, 1985).

As árvores foram construídas por alinhamentos múltiplos da sequência usando o programa ClustalX (Thompson et al., 1997). Todas as sequências de aminoácidos foram comparadas usando o software de exibição de árvore. O tamanho dos ramos foi estimado com 1000 repetições bootstrapped e o percentual de vezes em todas as espécies aparecem indicados como um grupo monofilético.

3.13- Estabilidade plasmidial

Baseado no método de Summers e Sherratt (1984) inoculou-se células de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pVCM04 fundido com o plasmídeo pUC18 em meio Lúria (meio L), suplementado com ampicilina e incubou-se à 37°C por 24 horas; 5 μ l dessa cultura foram transferidos para 5 mL de meio Lúria sem antibiótico e alíquotas foram plaqueadas em meio Lúria - ágar 1,5% (p/v), suplementado com ampicilina e placas com o mesmo meio sem o antibiótico. O restante da cultura foi mantida a 37°C por 24 horas, sob agitação de 150 rpm. Esse procedimento foi repetido durante cinco dias, com inoculações e plaqueamentos realizados a cada 24 horas.

3.14- Conjugação

O sistema de conjugação seguiu a metodologia descrita por Chiu, Lin e Ou, (2000), com modificações. A amostra da célula doadora lac Z negativa (*E. coli* DH5 α) contendo a fusão pVCM04/pUC18 e da célula receptora com características lac Z positiva (BH101), foram cultivadas separadamente em 5 mL de meio L. Após 1 hora de cultivo, misturou-se 50 μ l de cada célula em um terceiro tubo contendo 5 mL de meio L e reincubou-se os

cultivos bacterianos por mais 1 hora. Dois sistemas de conjugação foram realizados; no primeiro sistema foi pipetado 10 µl da amostra contendo os transconjugantes e 50 µl de meio L, posteriormente foram semeados em duas placas contendo o cromógeno X-Gal e o indutor IPTG sendo uma placa sem o antibiótico ampicilina e outra placa contendo o antibiótico. No segundo sistema foi realizada uma diluição pipetando 50 µl da amostra contendo os transconjugantes em 5 mL de meio L (diluiu 10²), misturou-se e realizou nova diluição pipetando 50 µl da primeira diluição em 5 mL de meio L (diluiu 10⁴), misturou-se e semeou como no primeiro sistema. Após 24 horas de incubação a 37°C foram contadas as colônias azuis e brancas obtendo o resultado da conjugação.

3.15- Meios de cultura e reagentes

3.15.1- Meio de Lúria (L) (Sambrook, Fritsh e Maniats, 1989)

Peptona	10,0 g
NaCl	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Água destilada (qsp)	1000 mL

O pH foi ajustado para 7,2 e o meio autoclavado a 121° C por 20 minutos.

3.15.2-Meio L-ágar (LA) (Sambrook, Fritsh e Maniats, 1989)

Meio L contendo 15 g/L de ágar.

O pH foi ajustado para 7,2 e o meio autoclavado a 121° C por 20 minutos.

3.15.3- Tampões

3.15.3.1- Tampão de eletroforese (TEB 5X) (Sambrook, Fritsh e Maniats, 1989)

Tris – HCl	53,85 g/L
Ácido Bórico	27,5 g/L
EDTA	1,8 g/L

O pH do tampão de eletroforese foi ajustado para 8,0.

3.15.3.3- Tampão de amostra 5X (Sambrook, Fritsh e Maniats, 1989)

TEB 10X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,001 g/mL

3.15.4- Tampões enzimáticos

Tampão da Taq DNA Polimerase;

Tampão (10 X) Taq DNA Polimerase 15 mM-MgCl₂ – (*Amersham-Pharmacia-Biotech*[®]);

Tampão para endonucleases de restrição *Eco* RI;

3.15.5- Enzimas

Foram utilizadas as enzimas *Eco* RI (20 U/μL), Taq DNA polimerase I de *E. coli* (5U/μL), T4 DNA ligase (400 U/μL) e T7 DNA polimerase, provenientes (*Promega Biotech*[®], *Amersham-Pharmacia-Biotech*[®]).

3.15.6- Soluções

Soluções para Extração de DNA plasmidial

As soluções I, II e III foram utilizadas seguindo as instruções do fabricante.

3.15.6.1- Solução I

Tris – HCl pH 7,5	100 mM
EDTA	10 mM
RNAse I	400 μg/mL

3.15.6.2- Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1%

3.15.6.3- Solução III

Acetato de sódio	3 M
Ácido acético	2 M

Outras soluções

3.15.7- IPTG

IPTG 100 mM

3.15.8- X-GAL

X-Gal – mM	0,04 g
N, N – dimetilformamida	1,0 mL

3.15.9- Brometo de etídeo (p /v)

Brometo de etídeo 10 mg/mL

3.15.10- Mistura de dNTPs

dATP	2,5 mM
dTTP	2,5 mM
dCTP	2,5 mM
dGTP	2,5 mM

3.15.11– Antibióticos

3.15.11.1-Ampicilina 100x

Ampicilina	100 mg
Água destilada	10 mL

3.15.12- Marcador de massa molecular

“1kb ladder” (*Amersham-Pharmacia-Biotech*[®])

1kb (*Promega Biotech*[®])

3.15.13- “kits” de uso específico em biologia molecular

Flex Prep Kit (*Amersham- Pharmacia-Biotech*®)

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*Amersham-Pharmacia-Biotech*®)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

“É preciso já ser sabido para amar a sabedoria” (Friedrich Von Schiller).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mendes (2008) isolou 53 amostras de *S. enterica Enteritidis* a partir de carcaças de frango. Mais de 80% das amostras isoladas apresentaram plasmídeos e, dessa forma, uma dessas amostras, contendo dois DNA extracromossomal, foi escolhida para que o seu material genético extracromossomal fosse caracterizado. Um dos plasmídeos apresentava 2,0 kb (pVCM01) e o outro 3583 pb (pVCM04).

4.1- Sequenciamento/Sequência nucleotídica do pVCM04

Para dar início aos experimentos de sequenciamento foi utilizado o plasmídeo pVCM04/pUC18. Inicialmente foram utilizados os “primers” "Forward" e "Reverse" do próprio pUC18 para começar a obter a sequência do plasmídeo pVCM04. A medida que realizava o sequenciamento e obtia as sequências, novos “primers” foram desenhados para dar continuidade ao sequenciamento, os “primers” utilizados estão descritos no quadro I (material e métodos – item 3.10).

Os “primers” foram desenhados aproximadamente 100 pb do fim da sequência obtida no sequenciamento anterior. A sequência completa do pVCM04 apresenta 3583 pb e está representada na figura 5.

1. GTCACCCGATTTGATGATTGGTGCCTTGATCCTGTCATCCGTGCTCCTCTTTGGGGGTTT 60
61. CGGGGCGCAGCCCTGAACAGCCACGGAGGCCGAGGGGTCTCTGTGTGTGCTGGCTTA 120
121. CTGTACTTAATGATGGCACGGAGAGATAAACATTTGGAAGAGTGGCATAGGGGGGAGGCAC 180
181. CATGGCGTAAGTCTCAATGCGGCATCCAGCTCCCTGGTCTTCCCTCGCCACTCGCTCG 240
241. CTACGCTCGGTCCTGGGGCTGCGGCAGCACTACCTACACACACAACAAGCACAAACGA 300
301. AACACATCAAGATGAGAAAACAAGACGGAAGAACTACTGATCAAAAAAACAACCAAAAAAAC 360
361. CTGTATATCTGATTTATGGGTAAATGACCTAGCACCTACAGTGCAAAAACAACCAAAAAAAC 420
421. AACCTGTATATCTGATTATGGTTCCTGACCTACTTTACACAAATATCCCGAAAACAGTGC 480
481. GAAAAACAACAAAGCGACCGTATATCTGATATAGACGCTTGTCTACTTTTACACGATTC 540
541. TTGAAAAGCGTATGCTGATATATGAAAAAACCCCGCAACGGAAGCAACCGTTCGGGGTCTG 600
601. TGGCAAAGCATGAAAAGGGAGTCCCCGCATTTGGAATTATACCAACAAGACCTGTTTGCAA 660
661. CCAATGCATTTCACAGTCCTCGCTGTTCGGACGATCTGAGCCAACCGCATAAGCGCGC 720
721. AAACGCTAGAGGACGCGCTACGGCGTCCCTACATCCAGGCTAATCCACAACGCGCGTGT 780
781. GGGTACTCCTGTTCGACGTTGACCAGCCCCTAGCGGCGCTGGCGTGGAAGCAGCCGGAC 840
841. TTCCGCGCCAAACGTGGACGGCACAAAACCCGAGAACGGGCACGCCCCATTGCCTACG 900
881. CGTGTAGCGCTCCTCGTAGCGAAGTCGACGCGGCGAAGCTCAAGCCCTGCGCTACTTGG 960
941. CACGCATACAGCACGCCATGACAGACGCCCTGAAACGCGCAACCGGGGCTATGTGCGTCTGA 1000
1001. TTACCAAGACTCCCAATCATGAACGCTGGCGTACAAACATATGGCGGCTGAAATTTAGC 1060
1061. AACTGGACGAACACGCGGACTACCTGCCAGACGATTTAGAGCTACC CAAGCGCATCACAA 1120
1121. AAGCCGAAGCAAACGCGCTTGGTCGCAATGTGTGGTGTGTTGATTGCTGCGGCAATGGG 1180
1181. CGTACCAGACACC GCGGACACTACGACAACCAATCCGGCATGGTTTATCGCCTGTATTACC 1240
1241. AGGCTGAAACTCTTAAACACATTTAGCACGCTCTTACCCTTAAACGAGGTGAACACCACG 1300
1301. CCAAAAACGCTAGCCAAATGGACATGGGAACGTTTCGACATTTGCCGCGAGTGACGCCAGAT 1360
1361. TTTAGAAAACAGGCGCACAGGGGAAAGAAAACAGCGGGA TAGTCCGCCAAATCAAAATGA 1420
1421. TTGATATACAAGCGGAGTACTGCGAATGAGTGGGAATCAAAAAGATCGCCAGAGAGCGAAA 1480
1481. CATGACAGCGAGGGAAGCCGCGAAAAAATTTGGTAAATCACACGACCCATCAGGCGTTT 1540
1541. GGTTGCGCTCGATCGTGACGAATACCTGAAGCGCGCCGAGACAAGCGCAAAAAGTCTA 1600
1601. TGACATGCGCATGAGTGGTGTCCGTGGGATGAAATAGC AAAAGCGTAAAAAGCACCTA 1660
1661. TCACAGCGTCAGAAGCATGTATTACAGCGTGTCCGCGAACTACAGGACTCGACAAAAAA 1720
1721. GGACACCAAACGGCAGATCTGTTTGGGGCTTAGTGAGCTACGGTCAAAGGTGCAAGCTC 1780
1781. GCCTGTGCTTTGACCGTAGCCAACAACGACCGTAGGGAGGCGTTAGCAGTCAACCGAGA 1840
1841. CATCGACATGCCACGGCTGAGCCTGTGAGCATATTCCCGCGCATCTGCATCACACCCG 1900
1901. CTCCAGGTGCTCAATACTTGCCTAATTCCTGAAATTCCTCGCTCAATTGCTCGACTTGT 1960
1961. TCGCGAAGTTTCCTGTTGTGCGGTGCTGTCTGTCTGCTAC TCGCTCTTCAAAGTCTGCAAT 2020
2021. AATCTGTGCAAGCTTCCCTCTCCGTTTCCACTTCCCGAGGACCTGAGACAGCTGTTGC 1080
2081. TCTATCTGGCTCTGGCTCATTCAGCCCTTTTCACTACC CGATATTGCGCATTGCGGCCA 2140
2141. TAAGTCGGTGCTATGGGATCTATCTCACGCATAACCGTCCCAGCTTCCCACAAGTGGTA 2200
2201. ACTTTGGCGTTCGGCAACTTGTCCAGCTCCGCA TAGCGGTTGCGGATTTCCGGTCTGCATC 2260
2261. CAGTACAGAACC CCGCCTCTAGCATCAGGACCGCCAGCATCGCGATAAGCGCTCCAAGC 2320
2321. CAACTCTTTAACAGGCTGGCCTCAATCGCCGGCTGTGTCTTTGGA TAGCGCTTTCGATT 2380
2381. TTCTTCTGCTCTGCTTTCAAGCATTC CAGCAAGGCGCTTTCGTGCTGCTTCAGCGCGGCT 2440
2421. TTGATTTCTCGTCGGTATCCGATGCCTGCTGCTTCAAT TTTTCCCTCGAAGCTCCTGGCT 2500
2501. AAATCAAAAATCTCGCTCATAAATCGTCCCTTT CAGTCTGATATTTTCCACCGTCCGG 2560
2561. TGCCTTACAGCTGATGCTGTTCTGGTAACCTCGAAAT TTCCAATCCTACGCTCTGTAT 2620
2621. TGCCTCAGAACGCTTTTCTGGTCTAATCAACCCCTTCCCTACCTGAGCCATTAACC 2680
2681. GCGTGTAAAGAGCTTCTGAGAGCGTTTACGCTCACGTTGTAATCTGGGATGTGGATAG 2740
2741. CGCACGTTGCCGAGTCGGATCATCAGGATCCGCAAGGCTATGTTCCGCGTTTATCGCTGT 2800
2801. TTTCCATGCGTCCACCCGTGGTCCGCTGCGGGGTCGTAATATGGCTGTAAGCGCTTGCC 2860
2861. GCTTTGTAATTAACGTTAGGGATAACAACAATCAGTTC CACACGCCCCCTTGTCTGTGTG 2920
2921. TTCCACCAAAGGGCGCTGACTGATCAGCATCCAGTCCAGGTAAGAGAACCCCTTCAA 2980
2981. CTCATCATGCACTGCTGACGTAACCTCGGGCTTATGCTGGATTCTCGAAGGACAACAC 3040
3041. CCGCTGGTGATGTTACGACTGAATC CCGCGCTGTTTATCAGCTCCCGCACCTTTCAGG 3100
3101. GTCACCCGCTAAACCGTTGCTCCCTCCCTCTGCGGATCTTGCCGAGAAGATAATCAAC 3160
3161. GGGGCCGGAGCC TCCGCTTTTCCCTGTGCCATGAACTTACCAGCATTTGATA TTGATGT 3220
3221. CCTGTAATCGCTTCTCGATGTGCCACAGCGCGCGAGAA TCTCTACGCGATCGCCATAAC 3280
3281. TCCACTGACCTGAATTGATACGACGGGCGATCTGATTCA GTAAATTAACCAACCCTGCCA 3340
3341. ACTGCCGACGACGCGGGGTCCACACGTTCCGGCTCGCC GCGGACGCTTCTGACCAAGCC 3400
3401. CAAGCTCACGCAACCACGGCGAAGCTCACCTGCGGGAC ACCGCTCCCTAAGCTCGGAAA 3460
3461. GTTCCCTCATCGGTCACGCGATTTTGATGGATTTGGTGC GCTTTGCATCGGTCATCCGGT 3520
3521. GCTCCTCTTTTGGGGTTTCGGGGGCGCACGCACTGAAC CAGC 3583

Figura 5- Sequência completa do pVCM04. O início da sequência codificante para o gene da Rep A está marcado por seta preenchida; para o gene da Rep B está marcado com seta pontilhada; para o gene codificante da Mob A está marcado por colchete; para o gene da Mob B está marcado com seta aberta; para o gene da Mob C está circulado e a sequência de reconhecimento da *EcoRI* está dentro de um retângulo.

A sequência nucleotídica do pVCM04 possui 3583 pb e é considerada como um plasmídeo pequeno. Quando os genes são traduzidos, codificam para cinco proteínas descritas como RepA, RepB, MobA, MobB e MobC. Não foram encontrados genes que codificam resistência a antibióticos ou que auxiliam na virulência da *S. enterica Enteritidis* estudada.

Chen, Strobaugh Jr e Frye (2010), descreveram três plasmídeos considerados pequenos, em *S. Typhimurium*, os quais podem ser comparados com o pVCM04. Os plasmídeos descritos apresentam resistência à kanamicina. Dois destes plasmídeos denominados pSN11 e pSN02 possuem ambos 5696 pb, outro plasmídeo determinado pG7601 apresenta 3208 pb, semelhante ao peso molecular encontrado no pVCM04. Os plasmídeos pSN11 e pSN02 contêm os genes de mobilização (MobABCD), compatíveis com os encontrados no pVCM04.

Plasmídeos considerados grandes, descritos em *Salmonella* sp, normalmente apresentam resistência a antibióticos ou contêm genes que auxiliam na capacidade de virulência da bactéria. Sajid e Schwarz (2009), descreveram dois plasmídeos em *Salmonella enterica Enteritidis* com 55 Kb e 90 Kb, ambos apresentam genes spvC, os quais estão envolvidos na determinação de virulência da *Salmonella* estudada. Olusesan et al., (2010) descreveram quatro plasmídeos em *Salmonella Typhi e Paratyphi*, com peso molecular de aproximadamente 23 Kb, que também possuem genes de resistência.

4.2- Sítios de restrição no pVCM04

A sequência nucleotídica foi submetida à análise através do programa "gene runner" para verificação dos possíveis sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição. Os sítios únicos de reconhecimento são importantes para permitir a manipulação do plasmídeo pVCM04. Entretanto os sítios encontrados não poderão ser utilizados para clonagem de promotores, marca de seleção ou regiões de múltiplos sítios de clonagem, por estarem

dentro de genes codificantes, como mostra o esquema da figura 6. No quadro II, a seguir, estão descritos os sítios únicos mais comuns encontrados no pVCM04 e no apêndice encontra-se uma lista completa dos sítios de restrição encontrado no plasmídeo deste estudo.

Quadro II – Sítios únicos de restrição importantes no pVCM04.

Enzimas de Restrição	Sequências que cortam	Posição que cortam/gene
<i>EcoRI</i>	5' G / AATTC 3'	1070 – 1076 / RepA
<i>BamHI</i>	5' CG / ATCC 3'	3154 – 3160 / MobA
<i>HindIII</i>	5' A / AGCTT 3'	2050 – 2056 / MobB
<i>PvuII</i>	5' CAGC / TG 3'	2090 – 2096 / MobB
<i>SacII</i>	5' CC/ GCGG 3'	3397 – 3404 / MobC

Foram detectados sítios únicos para reconhecimento das enzimas *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PvuII* e *SacII* (Quadro II). Tais sítios estão localizados dentro de regiões codificantes e se usados para clonagem podem inativar a expressão dos genes presentes no pVCM04.

O plasmídeo pVALAC descrito em *Lactococcus lactis* apresentou sítios de reconhecimento para onze enzimas de restrição. Existe uma região de múltiplos sítios de clonagem, onde os sítios enzimáticos não estão localizados em regiões que interrompam genes codificantes. Os sítios são de reconhecimentos para as enzimas *NheI*, *AffIII*, *KpnI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI* e *ApaI* (Guimarães et al., 2009).

4.3- Representação esquemática do pVCM04

A figura 6 mostra a distribuição dos possíveis genes no pVCM04. Além do posicionamento também são mostradas as orientações dos genes, local da possível origem de replicação e a localização dos sítios únicos de enzimas de restrição encontrados.

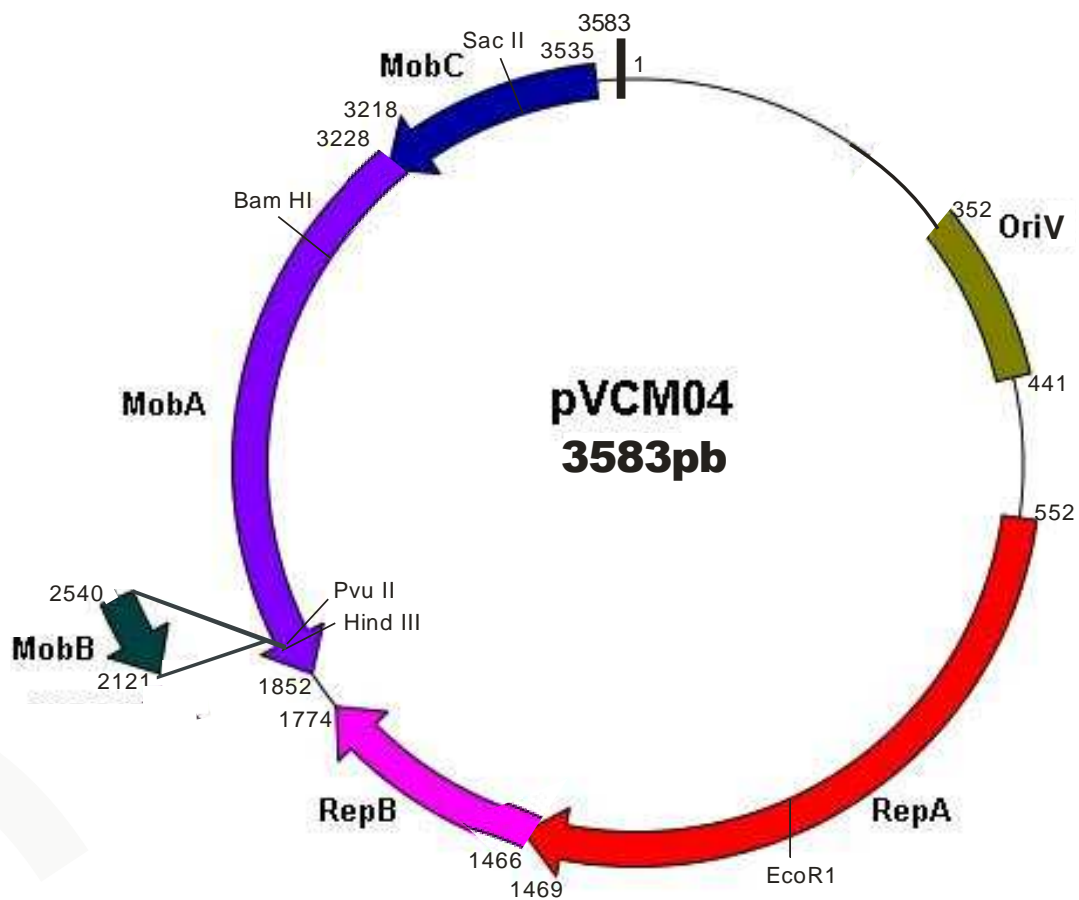


Figura 6- Representação esquemática do plasmídeo pVCM04.

Na figura 6 está representado o mapa do pVCM04, o qual apresenta dois genes codificantes para a enzima replicase (RepA e RepB), três genes codificantes para enzimas de mobilização (MobA, MobB e MobC) e os sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição, os quais estão inseridos dentro dos genes codificantes para proteínas do PVC04. Da primeira base do plasmídeo até a posição de 1774 pb (genes codificantes para replicases e OriV), há 52,8% de G+C e os 1891 pb finais (genes de mobilização) possuem 47,2% de G+C; estes dados são similares ao descrito por Guerry, Van Embden e Faldow, (1999), quando descreveram que o plasmídeo S-SuSm presente em *Salmonella* sp, possui 55% de G+C.

4.4 – Análise de homologia das “ORFs” do pVCM04

Foi realizada uma busca no banco de dados utilizando o programa BLAST. A sequência nucleotídica do pVCM04 foi utilizada, entretanto, não foi encontrado homologia com sequências depositadas no “GenBank”. Utilizando o programa ORF Finder "(Open Read Frame)" procurou-se possíveis quadros abertos de leitura que possam representar genes presente na sequência completa do pVCM04.

Doze possíveis genes, contendo mais de 50 aminoácidos, foram encontrados. As sequências deduzidas desses possíveis genes foram utilizadas para fazer uma busca no GenBank utilizando o programa BLASTp. Devido a homologia das ORFs do pVCM04 com proteínas de replicação e mobilização, os possíveis genes foram denominados de proteínas de replicação do plasmídeo (RepA e RepB) e proteínas de mobilização (MobA, MobB e MobC) (Ye et al., 2007, Altschul, Maden e Schaffer, 1997; Wheeler et al., 2006).

A tabela I mostra os resultados obtidos. Estão sendo apresentadas a identidade e similaridade das prováveis sequências de aminoácidos que formam as ORFs do pVCM04 com aquelas sequências de aminoácidos encontradas em banco de dados, que apresentaram E-value (E^{-22}), consideradas mais adequadas para o estudo.

Tabela I – Caracterização das ORFs, percentual de identidade e similaridade com as proteínas depositadas no GenBank.

ORF/ sequência depositada no GeneBank / Nº de acesso	Posição das ORFs no pVCM04 / Tamanho da proteína	Suposta Proteína	Identidade	Similaridade	E - value
ORF 1 pSM76 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (EF535851.1) Plasmídeo de <i>Thiomonas intermédia</i> K12 (NZ_ACXV01000048.1)	552 – 1469 (305 aminoácidos)	Rep A Replicase	44% 45%	58% 58%	2e-56 7e-50
ORF 2 pCCK647 de <i>Pasteurella multocida</i> (NC_006868.1) pNC903 de <i>Rhodococcus ruber</i> (AB218986.1)	1466 – 1774 (102 aminoácidos)	Replicase Rep B	46% 40%	68% 63%	9e-17 3e-08
ORF 3 pALVA de <i>Hafnia alvei</i> MISC230 (NC_005910.1) pSW200 de <i>Erwinia stewartii</i> (AAA69498)	1852 – 3228 (458 aminoácidos)	MobA MobA	54% 52%	73% 71%	3e-91 3e-90
ORF 4 pHE1 de <i>Halomonas elongata</i> (AJ243735) pASA13 <i>Aeromonas salmonicida</i> (NC_004340)	2121 - 2540 (139 aminoácidos)	MobB MobB	38% 33%	58% 54%	4e-20 7e-14
ORF 5 pSM35_8 de <i>Escherichia coli</i> SMS-3-5 (NC_010485.1) ColE1 de <i>Salmonella enterica</i> (NP_040368.1)	3218 - 3535 (105 aminoácidos)	MobC MobC	49% 47%	67% 65%	1e-18 2e-17

A ORF1 com 305 aminoácidos apresentou homologia com a proteína RepA dos plasmídeo pSM76 de *Stenotrophomonas maltophilia* e pK12 de *Thiomonas intermédia*. A

ORF2 codifica para uma proteína de 102 aminoácidos e apresentou homologia com proteínas de replicação plasmidial (RepB) de alguns plasmídeos. Apresentou 46% de identidade e 63% de similaridade com a proteína replicase do plasmídeo pCCK647 de *Pasteurella multocida* e 40% de identidade e 60% de similaridade com a proteína RepB do plasmídeo pNC903 de *Rhodococcus ruber*.

As ORFs 3, 4 e 5 foram agrupadas e estão relacionadas com proteínas de mobilização. A ORF5 apresentou 49% de identidade e 67% de similaridade com a proteína MobC do plasmídeo pSM35_8 de *E. coli* SMS-3-5 e 47% de identidade com a MobC do plasmídeo Cole1 de *S. enterica*. Enquanto a ORF3 apresentou homologia com a proteína MobA do plasmídeos pALVA de *Hafnia alvei* MISC230 e do plasmídeo pSW200 de *Erwinia stewartii*. A ORF4 está contida dentro da ORF3, mas em outra fase de leitura, fato comum entre genes que codificam proteínas de mobilização (Haake e Wang, 1997). Esta ORF apresenta 139 aminoácidos com 38% de identidade com a proteína MobB do plasmídeo pHE1 de *Halomonas elongata* e 33% de identidade com a MobB do plasmídeo pASA13 de *Aeromonas salmonicida*.

4.5- Análise das ORFs 1 e 2

A sequência nucleotídica correspondente a replicase foi traduzida e submetida ao “GenBank”, o alinhamento mostrou identidade entre a proteína replicase do pVCM04, com a proteína replicase do pSM76 de *P. multocida* e a replicase do plasmídeo presente em *T. intermédia* K12. As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X.

pVCM04	MLIYEKTPQRKQPFQVVARTEKGVPALELYQQDLFATMPFSPRPLCSDDLSHGIWRETLE	60
pSM76	MERKEKPRSDGNRSRGRGQDRRPKTMRPHYQPELFLAS-APKRPFCADDLGTGLRIRSQE	59
pT.intermedia	MIEQLSLFAER-LPHRPHYCSDDKTARLIRSRAR	32
	* . ** * ** * : * * : .	
pVCM04	DALRRPYIQANPQRRVWVLLFDVDQPLAALAWEAAGLPPPTWTAQNPENGHAHIAYALSA	120
pSM76	QAMGHRYIQHNPPHALAFLVDFDRSGALVAADDAGLPLPSWVAENRDTRRGHLAYALAC	119
pT.intermedia	-ALQFPYIQVNPPLRFLWLPFDLDKPGGAVAWEDALLPPAVAIGNPHNGHAHLLWGLEA	91
	* : * * * * : * * * . : . : * : * * * : . * . . : * : * .	
pVCM04	PVAKSDAAKLPRLRLARIQHAMDALN---ADRGYVGLITKTPNHERWRNTNIWRPEFYE	177
pSM76	PVIITDAARSAPMRYAAAVEQAYRDALQ---ADSGYSNFITKTPGHQDWETRWGRADAYT	176
pT.intermedia	PVATGDAARAAPLRYLAAIEGAMLAKMLPHGADPGFAGLIVKNPAHEKWRTHWGPPHLYG	151
	** . * * : * : * * : * : * : * * : . : * . * * : * . * . . . *	
pVCM04	LDELRDYLPDDLELPKR--ITKAEAIGLGRNVWLFDSLRL--HWAYRHRRHYNHP--AW	230
pSM76	LEELADYLPNGLPSLRK---RREEASGLGRNVSLFEGRL---SWAYRARKQFDDVG--EW	228
pT.intermedia	LGELAEWLDLDFKPKRALLKEIEGYGVGRNVSLFNALGPEGKWAYTAVRRYRKGKPFGEW	211
	* * * : * . : : . * . * : * * * * * : * * * * * : * * * : : . *	
pVCM04	FIACIHQAETLN-TFSTPLPFNEVNTTAKSVAKWTWERFDIAASDARFSEKQAHGRNRSG	289
pSM76	HRATLTRAKVLNGDFAQPLPASEVRATAKSVGKVVWTRLGHGPAGEAFFARQTRKKGHLSG	288
pT.intermedia	EIAVLAKAQEMNGEFRTPMDCNEVRHIAKSVAKWTWK--QDKARAAEFQRQSYKGRSG	269
	* : * : * : * * * : . * * . * * * * * . * * * : * : * : * *	
pVCM04	IVRQIQILID-IQAELLR	305
pSM76	ISRQSNAMD-TAQRILEFRK	307
pT.intermedia	EVRAAASEDRRASARLMAASGMTQQVIAQALGVTDRTVRNWIND	313
	* * . : :	

Figura 7- Alinhamento entre proteína RepA do pVCM04 e a RepA do pSM76 isolado de *P. multocida* e a replicase do plasmídeo presente em *T. intermedia* K12.

Na figura 7 estão expostos os resultados de identidade da sequência protéica de replicase do pSM76 (nº de acesso: EF535851.1) apresentando 44% de identidade e 58% de similaridade quando comparada com a sequência deduzida de proteína (305 aminoácidos) do plasmídeo pVCM04. Os asteriscos representam os aminoácidos com identidade e os pontos representam similaridade. Análises por meio do programa BLAST demonstram que a sequência codificante para a proteína replicase presente no pVCM04, quando comparada com outras replicases plasmidiais descritas em banco de dados, apresenta dois domínios conservados, os quais são denominados como “replicase superfamily” e PriCT-1, estes dados reforçam que a ORF2 do pVCM04 analisada codifica para replicase.

Foi analisada também a fase +2 da ORF2 do pVCM04 e observou-se que esta apresenta homologia com a proteína replicase (RepB) de outras sequências depositadas no banco de dados. Depois de traduzida uma segunda sequência nucleotídica correspondente a replicase do plasmídeo pVCM04 foi analisada no “GenBank”, onde os dados mostraram identidade com a proteína replicase do pCCK647 de *P. multocida* e replicase do pNC903

de *R. ruber*, as sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X.

pVCM04	MSGNQKIARERNMTAREAAKFKGSPRTIRRLVALDRDEYKRAADKRQKVYDMRMSGCP	60
pCCK647	MRTVKKIARERNMTAKGAAKFKGSTRTIQRLVALDRSDYERRADERRKMAYNLRLQGKK	60
pNC903	-MGAETPAR-RNR TAREVAERIGASPRTVRR IIAEPRASYEARAAERKRVLLELRANGMK	58
	: . ** ** ** : . *: : * * . * * : * * * : * * . * * * : * : . * * * : . : * . *	
pVCM04	WDEIAKAVKSTYHSVRSMY--YQRVRELQ----DSTKKDTQTADLFGA	102
pCCK647	WKEVGEALGCSDEAARALYKRYLALQEKKQKEAEEAKNETANYDLFMD	108
pNC903	LREIAAEVGMsvGGVGTIL---HHARKAE-----QSKAEGAMA	93
	* : . : : . : : : : : : : : : : : : : : * : :	

Figura 8- Alinhamento entre proteína RepB do pVCM04 com RepB do pCCK647 de *P. multocida*, replicase do plasmídeo pNC903 de *R. ruber*.

Na figura 8 estão expostos os resultados de identidade e similaridade da sequência protéica de replicase do pVCM04 (102 aminoácidos) com a replicase do pCCK647 de *P. multocida* (108 aminoácidos totais). Análises demonstram que a replicase (RepB) do pVCM04 apresenta 46% de identidade e 68% de similaridade com a replicase do plasmídeo pCCK647 (nº de acesso: NC_006868.1), estas informações estão representadas na Tabela II. .

A sequência obtida, foi utilizada para buscar homologia com outras sequências depositadas no “GenBank”. Utilizando o programa Blast (Altschul, Madden e Schaffer, 1997), foram encontradas homologias com replicases de plasmídeos presentes em organismos tais como: *Rhodococcus* sp, *Mycobacterium fortuitum*, *R. rhodochrous*, *Rhodococcus erythropolis*, *P. multocida* e *E. coli*.

Os plasmídeos ColE2 e ColE1 de *E. coli* também apresentam replicação do tipo theta. A homologia com os plasmídeos de *E. coli* reforçam a possibilidade de que o plasmídeo pVCM04 também possui um mecanismo de replicação do tipo theta (Gregorova et al., 2004).

4.7- Análise da ORF3

Ao ser traduzida a sequência nucleotídica correspondente a MobA do plasmídeo pVCM04 foi analisada no “GenBank”, onde os dados mostraram identidade de aminoácidos com a proteína MobA do plasmídeo pAlvA de *Hafnia alvei* MISC230 e MobA do plasmídeo pSW200 de *Erwinia stewartii*, as sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X e o resultado está exposto na figura 9.

pSW200	MIVKFPGRGRSGAGPVDYLLGKDRQRDQATVLRGKPEEVRELIDASPYAKKYTSGLVLSF	60
pVCM04	MLVKFMARGKGGSGPVDYLLGKDRQREGATVLRGDPEQVRELINSAGFSRNYTSAVLSF	60
pAlvA	MIVKFHARGTGKGGSPVDYLLGKDRARVDKLLRGASEEVIALLIDSSPYAKKYTSGLVLSF	60
	*:*** .** * * :***** * .*:*: * .*: * **:: :****.***	
pSW200	SEQDLPPGQREKLMAFERVLMPLGLDKDQYVSVLWVEHQDKGRLELNFLIPNTELLTGKRL	120
pVCM04	EESSISPELR-QCMDEFERVLLPGLDADQYSALWVEHTDKGRVELNVVIPNVELQSGKRL	119
pAlvA	AEADLASETKQKVMDSFERALLPGLDADQYVSVLWVEHRDKGRLELNFVIPNIELQRGKRL	120
	* .:. : : * .***.**:**** * ** .*** ** ** ** **:***.*** ** **	
pSW200	QPYDRADRPRINAWQTIIVNGRLGLHDPNAPENRRALVTPSALPEAKQEAASITRGLLS	180
pVCM04	QPYDPADRPRVDKWTAINAEHSLADPDDPTRQRALSTSPDLPRERKTLSEALTRGLMA	179
pAlvA	QPYFDRADRPRIDAWQTVVNAQLGLHDPNDPLNQRALVTANSLPREKQAAAEATHGLLR	180
	: * **:::: * .:. * ** : * .:*** * . ** .: : :****:***	
pSW200	LASSGELKTRQDVTEALESAGFEVVRTTKNSISIAGPDGGRNIRLKGAIYEQSFNAGEGL	240
pVCM04	QVGEGLIRTRKDVLEAIQSVGLEISRVTNRNSISVKAPDGGKNIRLKGTYERDFEFSQEL	239
pAlvA	RIDAGEIKNRADVVEALRDAGFSVVRQAKNSISLASPDGGQNLRLKGAIYQDFRFSEGL	240
	. * :*: * ** **:::***: * :****: .***:***:***:*** * .:. : *	
pSW200	RAEIESAAADYRRAAESRIQRAREVCQSGTERKREENQRRHPRPRPEAVLSHEPAHERDA	300
pVCM04	RGKIEAAGIGYRRENQSRAEAARKRLAGMLESRAEENRKRYPRTQPAIEGQPVKELAWS	299
pAlvA	RAEIDKAGEHYRSESRARVQSARERYQYGVALKRAENQQRYPRAELNDALDGVKLVDR	300
	.:: * . ** : .*: : ** : : **:::***.	
pSW200	ADGQPDVADHRPGVRAADRFRER---GHSVVAAGADTRQLYDHTGAEHAGHAVREKQRR	356
pVCM04	YRDAGGPDARRRGSVLDDDRNPQLCGAGQVAERQSYHLWEAGTVMRGDRSHSTDLWPEW	359
pAlvA	GWSVGDVVSGRERAVVARDTDT---GERAVD---DRTVGYVEKVEHEDVGHVSVRGYER	353
	. . * : * * * :	
pSW200	AAHDMRRAETPLREGEPEGSGITIRRFELDDPGGEIAHDGAGKT-VAERIRAATAGLLEKA	415
pVCM04	RISGS---ERGLNEPEPDRATAVSGPAGSGNGE-----GSLRQIADFEERV	403
pAlvA	SLFGV---TEGRESEPELDVGRDTAGCQIGEEVNTDDSI RAGI IERLRGVTAELRDA	409
	. . . * ** . . * : * * : .	
pSW200	GRVGERLRGMADDVWSYATGERGAERARHGFEQAGAEFERSAAPFVTRLNGIEALREQER	475
pVCM04	RTDTTRQQ-----ETSRTSRAIERGISASIEHLE-----	435
pAlvA	TSVVGKLRVAADVHDYFRVTGGNLERAEHPLVSESEQVARAGK----RL-----EWSG	458
	: : . ** : : . .	
pSW200	AAQHQALELERSQRQRT--YDGPSL	499
pVCM04	AVVMQMRREYAHRLSRGMSMSR	457
pAlvA	AELKQASVEYQRQIRRDSPRFKGLEL	484
	* * * : :	

Figura 9- Alinhamento entre proteína MobA do pVCM04 com MobA do pAlvA de *Hafnia alvei* MISC230 e MobA do plasmídeo pSW200 de *Erwinia* sp.

Na figura 9 se encontram os resultados de identidade e similaridade da sequência protéica MobA do plasmídeo pAlvA de *Hafnia alvei* MISC230 (nº de acesso: NC_005910.1) a qual apresenta 54% e 73% de identidade e similaridade respectivamente com a MobA do pVCM04. A sequência de MobA do pVCM04 possui 457 aminoácidos e a sequência MobA do plasmídeo pAlvA de *H. alvei* MISC230 apresenta 484 aminoácidos totais.

A sequência nucleotídica correspondente a provável proteína MobA do plasmídeo

pKW1 (*Pseudomonas* sp) revela uma OriT já caracterizada e que não apresenta homologia com a MobA do pVCM04. Resultados semelhantes à MobA do pKW1 foram descritos por Hays et al., (2005), em análises de sequências nucleotídicas do plasmídeo pEMCJH03 de *M. catarrhalis*.

4.8- Análise da ORF4

A proteína MobB do pVCM04 contém um domínio transmembrana, detectado pelo programa PhDhtm (Rost, Fariselli e Casadio, 1996). O resultado está apresentado na figura 10.

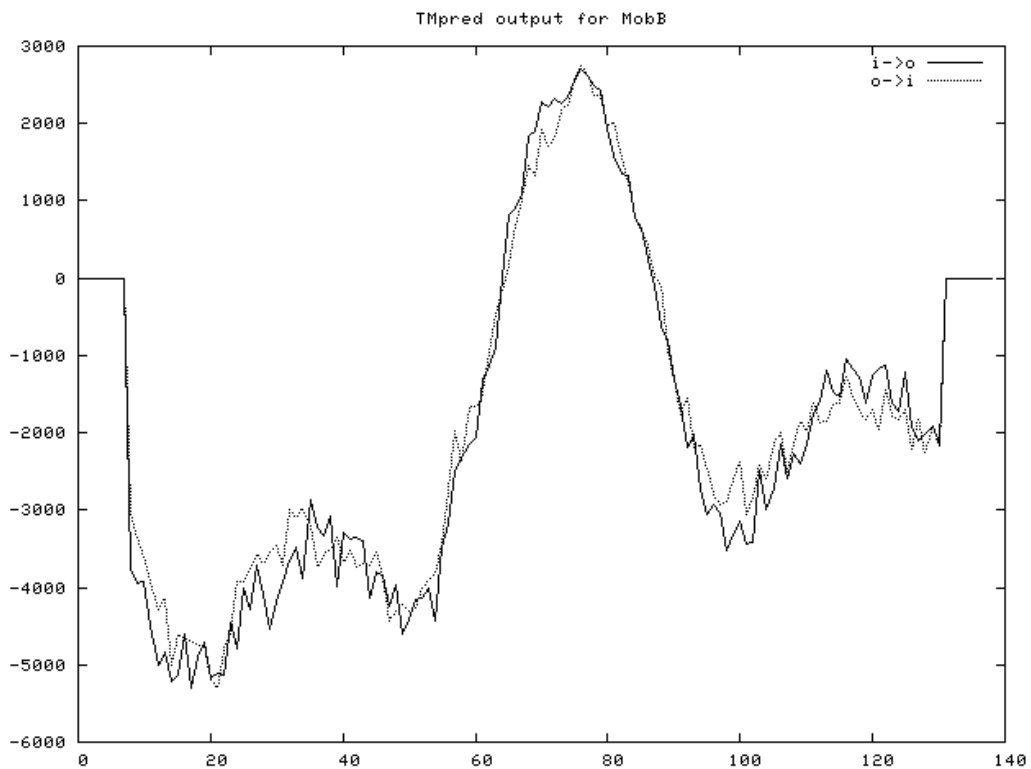


Figura 10- Análise de formação de hélice transmembranica para a proteína MobB do pVCM04.

A proteína MobB do pVCM04 apresenta formação de hélice transmembranica na região externa N-terminal. Becker e Meyer (2002) investigaram a possibilidade de um

aminoácido histidina na região C-terminal ser responsável por ativar a transferência dos plasmídeos que apresentam tais características e detectaram que o aminoácido está associado com a membrana. Os autores descreveram um plasmídeo que apresenta uma MobB contendo um aminoácido histidina na região transmembranica, o qual está sob controle do repressor lac.

Roy e Isberg (1997) estudaram a possibilidade de a MobB precipitar e investigaram se a presença desta proteína no pellet membranoso era precipitado ou era mesmo uma verdadeira associação da proteína MobB com a membrana. Dessa forma, os pesquisadores purificaram os fragmentos de membrana em gradiente de sacarose e os resultados mostraram que a MobB permanece associada com a membrana, sugerindo que é uma proteína integral de membrana.

Ao ser traduzida a sequência nucleotídica correspondente a MobB do plasmídeo pVCM04 foi analisada no “GenBank”, onde os dados mostraram semelhança com a proteína MobB do Plasmídeo pHE1 de *Halomonas elongata* e MobB do plasmídeo pAsa13 *Aeromonas salmonicida*, as sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X e os resultados estão expostos na figura 11.

pVCM04	MSEILNLARSFEEKLKQQASDTDEKIKAAALKQHESSALLECLKAEQKKIESAIQEHRRRLR	60
pHE1	MSEMSRLATAFEERSKEQAESTEKAVRSAFEKHESALLSALSESEKRTSDAIRAQSRLSLL	60
pAsa13	MSKILELAKTFEKSSKQQASDIETSVKNAFEPHEKAILEALDSSGRRLNAAIDAQSRRWG	60
	:: . :*** :***. . : : : *:: **.***. . . : : . ** :**	
pVCM04	ASLLKSWLGLIAMLAVLMLGGGVLY---WMTT----EIRNRYAELDKLPN----AKVTT	109
pHE1	ADALRSWMAVTIPIIASLALGLGAMVTMGWYITGQINEIASHNATLEQLKNEGGAIQLSR	120
pAsa13	WLVKKGWVFPPLIGVAFLLGISWVVVYQGRVIAENWVEISRQNKLTLEQLTAKGGKLELST	120
	:.: * : * :. . : : : ** : ** : ** : **	
pVCM04	CGKLGRLCVEIDPIAPTYGPNGE----YRVVKGK	139
pHE1	CGESRRLCARIDESAGVYGEDRT----YRVLEGY	150
pAsa13	CGEDKRLCVKVDLKELAYGDKEKDEYPMIPEGY	154
	** : ***. . : * . ** . : : : *	

Figura 11- Alinhamento entre MobB do pVCM04 com MobB do plasmídeo pHE1 de *Halomonas elongata* e MobB do plasmídeo pAsa13 *Aeromonas salmonicida*.

Os resultados de identidade e similaridade do pVCM04 comparados com os resultados da MobB do Plasmídeo pHE1 de *H. elongata* (nº de acesso: AJ243735) e com a MobB do plasmídeo pAsa13 *A. salmonicida* (nº de acesso: AAP69899.1), apresentaram 38% e 33% de similaridade respectivamente. A sequência da MobB do pVCM04 possui 139 aminoácidos, ao comparar, percebe-se que as sequências protéicas de MobB do

Plasmídeo pHE1 de *H. elongata* possui 150 aminoácidos e que a MobB do plasmídeo pAsa13 *A. salmonicida* possui 154 aminoácidos. O resultado do BLAST informa a presença de domínio conservado MobB-N pertencente a família MobB, este dado aumenta a confiabilidade no resultado encontrado.

4.9- Análise da ORF5

Depois de traduzida e submetida ao “GenBank”, a sequência nucleotídica correspondente a MobC do plasmídeo pVCM04 foi analisada e os dados mostraram aproximação em aminoácidos com a proteína MobC do plasmídeo pSM35_8 de *E. coli* SMS-3-5 e com o plasmídeo ColE1 de *S. enterica*. As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X e estão representadas na figura 12.

pWQ799	MLTIRVTDDEHARLLERCEGKQLAVWMRRVCLGEPVARS GKLP TLAP PLLRQ	52
pVCM04	MTDAKRTKSIKIRVTDEELSELRERCPAGELAPWLRELGLGQ--KRPRRAERVDPALLRQ	58
pColE1	MIPMKRERMLTIRVTDDEHARLLERCEGKQLAVWMRRVCLGEPVARS GKLP TLAP PLLRQ	60
	:.*****:* :.* *** . :** *:*. : ** : * . : : *.****	
pWQ799	LAAIGNNLNQTARKVNSGQWSSGDRVQVVAALMAIERELRSLRQVVREHGARDDS	107
pVCM04	LAGVGNLLNQIARRINSGQWSYGDRVEILAAALWHIEKRLQDININAG-----	105
pColE1	LAAIGNNLNQTARKVNSGQWSSGDRVQVVAALMAIERELRSLRQVVREQGARDDS	115
	.: *** **::***** **:::*** **:.*:.:.	

Figura 12- Alinhamento entre proteína MobC do pVCM04 com MobC do pWQ799 e MobC do plasmídeo ColE1 de *S. entérica*, destacado em vermelho encontra a região de domínio.

Os resultados de identidade da sequência protéica de pWQ799 (nº de acesso: AAC98398.1) e do ColE1 (nº de acesso: NP_040368.1) com o pVCM04 apresentam ambos 50% e 49% de identidade e 69% e 47% de similaridade respectivamente (Tabela II). Ao comparar identificamos que a sequência da proteína MobC do pVCM04 é constituída de 105 aminoácidos, a sequência total da MobC do pWQ799 possui 115 aminoácidos e a MobC do ColE1 também apresenta 115 aminoácidos. O resultado do BLAST informa a presença de domínio conservado MobC (MobC superfamily), este dado aumenta confiabilidade no resultado encontrado.

Ao realizar análises dos motivos característicos da MobC, observou-se que a proteína MobC do pVCM04 possui motivos conservados com outras MobC descritas em outros plasmídeos. O motivo (LAGVGNLLNQIARRIN) presente no pVCM04 apresenta

região consenso com (LSKLGANVNQIAKYCN) do pC221 e com (LGSMGANVNQIAKWFN) do pC223 (ambos encontrados em *Fusobacterium nucleatum*). Os resultados de conservação do motivo da MobC neste estudo, assemelham-se também aos três motivos conservados encontrados para a proteína de mobC do plasmídeo pMV158, dessa forma tal proteína pode ser considerada da super família das relaxases (Francia et al., 2004).

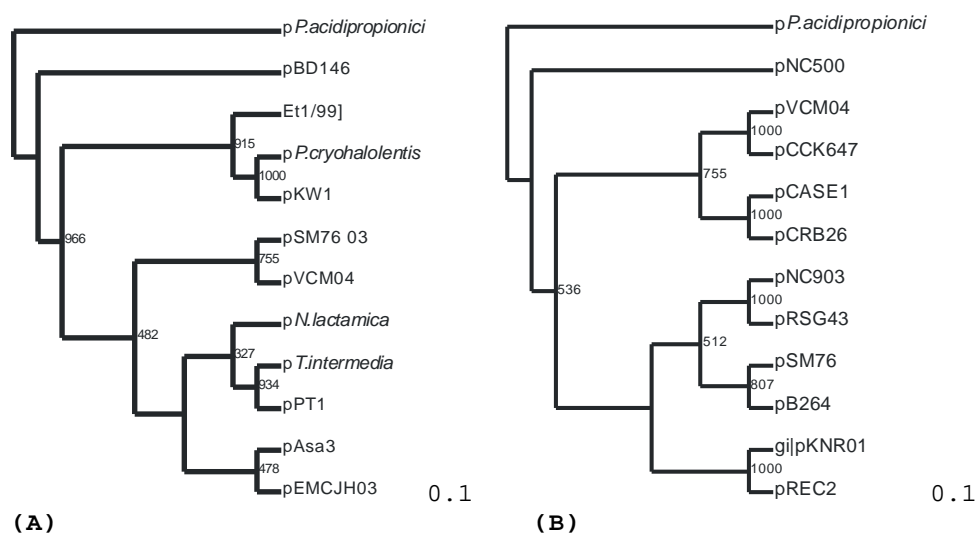
4.10 - Caracterização evolutiva plasmidial

Diagramas filogenéticos baseados em análises computacionais de ácidos nucleicos (DNA, RNA) e proteínas (aminoácidos) podem reconstruir a história evolutiva dos organismos vivos a partir dos quais estas macromoléculas foram isoladas. A transferência horizontal de genes é um evento que explica a evolução e pode ser estudada a partir dos diagramas (filogenia); os quais ajudam a estabelecer os detalhes das relações e os componentes essenciais dos sistemas vivos. Genes presentes em DNA de replicons, plasmídeos e vírus, podem ser transferidos entre os seres vivos e manterem conservadas suas sequências nucleotídicas, codificantes para proteínas ou enzimas, ao longo da linhagem evolutiva (Marchler e Bauer et al., 2009).

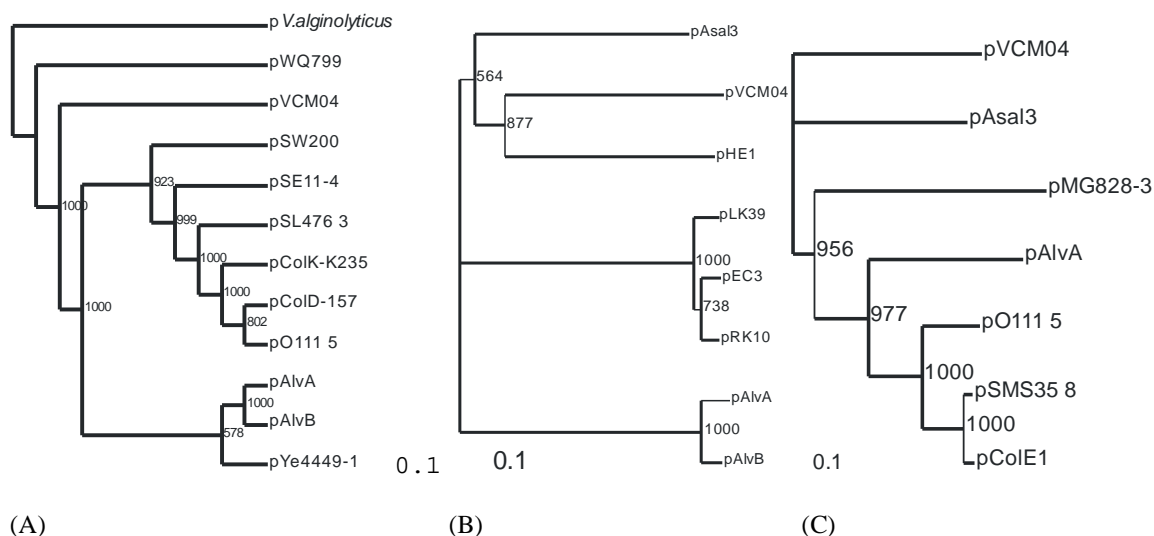
Neste estudo, foram comparadas as sequências de aminoácidos das proteínas do pVCM04 com outras sequências depositadas nas bases de dados. As proteínas foram organizadas e as árvores filogenéticas construídas a partir dos alinhamentos. Isso permitiu uma avaliação dos sistemas de transferência conjugativa entre os plasmídeos analisados. As relações filogenéticas das proteínas também foram analisadas e resultaram em filogenias das replicases e das relaxases. Pelos dados analisados observou-se que as proteínas denominadas RepA e RepB apresentaram similaridade com replicases de plasmídeos presentes em bactérias Gram positivas, entretando, as proteínas MobA, B e C não apresentaram similaridade com outras proteínas de mobilização plasmidial presentes em bactérias Gram positivas. Porém, todas as proteínas apresentam determinada similaridade com proteínas plasmidiais de bactérias Gram negativas.

4.11- Caracterização evolutiva das replicases e dos genes de mobilização

As sequências deduzidas de aminoácidos foram utilizadas para realizar a análise filogenética das proteínas RepA, RepB, MobA, MobB e MobC depositadas no *GenBank*, utilizando o programa CLUSTALW. As figuras 13-A e 13-B mostram as árvores filogenéticas obtidas, utilizando as sequências de aminoácidos codificantes para RepA e RepB, respectivamente. Na figura 14 são mostradas as árvores filogenéticas referentes às proteínas de mobilização.



Figuras 13A e 13B- Histograma das proteínas RepA e RepB deduzidas da sequência do pVCM04 e outras replicases depositadas no banco de dados.



Figuras 14 (A); 14 (B) e 14 (C)- Histograma de homologia das proteínas MobA, MobB e MobC deduzida da sequência do pVCM04 e outras sequências protéicas de mobilização depositadas no banco de dados.

Analisando as figuras 13A e 13B, constatamos que as proteínas de replicação plasmidial do pVCM04 são próximas filogeneticamente às proteínas de replicação dos plasmídeos relacionados na legenda (a legenda encontra-se no apêndice), sempre formando grupos com elevado valor de bootstrap. Com relação às proteínas de mobilização o mesmo não ocorre; as MobA e MobC se apresentam em ramos separados das outras proteínas de mobilização estudadas. Apenas a MobB formou um grupo com a proteína MobB presente no plasmídeo pHE1 de *H. elongata*.

Os dados de filogenia molecular reforçam a idéia de que o plasmídeo pVCM04 é bastante diferente dos plasmídeos depositados no *GenBank*, sugerindo ser importante estudar mais detalhadamente este plasmídeo. Filogeneticamente os genes de replicação encontrados neste estudo encontram-se agrupados com outros genes de replicação presentes em outros plasmídeos; porém, os genes de mobilização do pVCM04 não se agruparam com outros genes de mobilização plasmidiais analisados. Estes dados sugerem que o pVCM04 possa ser resultado da fusão de diferentes plasmídeos. Esta afirmação é reforçada ao analisarmos a tabela III (encontra-se no apêndice), a qual demonstra os codons comuns para cada um dos genes presente no pVCM04.

4.12- OriV no pVCM04

Os primeiros 540 pb do pVCM04 não estão associados com nenhum possível gene presente em outros plasmídeos do banco de dados. Entretanto nesta região são encontradas algumas características relacionadas à origem de replicação plasmidial. Segundo Reece (2004), a OriC (cromossomal) é uma sequência de DNA em torno de 245 bp que atua como sítio de ligação para proteínas que promovem a abertura da dupla hélice do DNA.

Neste trecho do pVCM04 existe uma região rica em G+C, posteriormente uma região rica em A+T, seguida de duas sequências repetidas diretas, as quais podem representar os interons, descritos por Chatteraj e Scheneider (1997) como sendo os locais importantes para codificação da proteína replicase.

A OriV, possui características específicas para cada tipo de replicação (Del solar et al., 1998). Na origem de replicação do tipo theta são encontradas sequências repetidas diretas com bases AT nas regiões adjacentes. São sequências múltiplas de Dam metilação, presentes na origem de replicação do cromossomo de *E. coli*. O processo de Dam metilação não é essencial e não se encontra presente em outras replicações plasmidiais (Abeles, Brendler e Austin, 1993).

Na figura 15 está representado em negrito a região de OriV do pVCM04 e o motivo de ligação da proteína DnaA.

1.	CTACGCTCGGTCGCTGGGGCTGCGGCGAGCACTACCTACACACACAAACAAGCACAACGA	60
61.	AACACATCAAGATGAGAAACAAGACGGAAGAAGCACTACTGATCAAAAAGCAACC AAAAAAC	120
121.	CTGTATATCTGATTATGGG TAAATGACCTAGCACCTACAGTGCAAAGAACAACCA AAAAA	180
181.	AACCTGTATATCTGATTATGG TCCTGAC CCTACTTTACAC AAATATCCCGAAAACAGTGC	240
241.	GAAAACAAACAAAAGCGACCGTATATCTGATATAGACGCTTGT CCTACTTTACAC GATTC	300

Figura 15- OriV do pVCM04. Em negrito está destacado a região de oriV e destacado de vermelho e sublinhado encontra-se o motivo de ligação da proteína DnaA.

A primeira sequência repetida direta apresenta 26 pb (AAAAAACCTGTATATCTGATTATGG) sendo separadas por 37 pb da segunda sequência repetida. A segunda sequência repetida direta apresenta 12pb (CCTACTTTACAC) e são separadas por 63 pb entre elas, sendo que a parte final desta sequência apresenta o motivo de ligação da proteína DnaA (TTTACAC) presente na OriC

de várias bactérias, bem como em vários plasmídeos com replicação do tipo theta. Esse arranjo sugere que esta região represente a origem de replicação do tipo theta do pVCM04 (Pacek, Konopa e Konieczny, 2001).

4.13- Motivos importantes no pVCM04

A sequência traduzida de proteína foi analisada no programa PROSITE (Falquet et al., 2002) e foram obtidos alguns motivos importantes para atividade funcional das proteínas presentes no pVCM04. Os sítios com suas respectivas sequências e localização estão descritos na tabela II.

Tabela II – Descrição dos motivos importantes encontrados no pVCM04.

Motivos	Sequência	Localização (aminoácidos)
Sítio de cAMP	KRiT	RepA (193 – 196)
Sítio de ATP e GTP	AakkFGKS	RepB (18 – 25)
Sítio de cAMP	RRgs	MobA (310 -313)
Zíper de leucina	LkswlgaLiamlavLmlgggvl	MobB (64 – 85)

Dentre os motivos localizados na proteína RepA e MobA, foi encontrado o sítio de cAMP. Há descrições de que a proteína receptora cAMP (CRP) é codificada pelo gene *crp*, o qual regula a transcrição de uma variedade de operons, que controlam o transporte de açúcares e possuem funções metabólicas (Botsford e Harman, 1992). Cepas de *S. Typhimurium* e *S. choleraesuis* com deleções neste gene não apresentam virulência em camundongos (Kelly, Bosecker e Curtiss, 1992; Zhang et al., 1997) e essas estirpes demonstram serem boas propostas para desenvolvimento de vacinas (Zhang et al., 1999; Kennedy et al., 1999; Uzzau et al., 2005). O tipo selvagem do gene *crp* em *S. gallinarum* já foi descrito por ser virulento em frangos (Chadfield et al., 2003).

Mutação no gene confere menos invasão em cultura de células com cepa de *S. Choleraesuis* (Kelly, Bosecker e Curtiss, 1992). Entretanto, desconhece-se que um procedimento de inativação da proteína CRP confere atenuação da virulência em *S. gallinarum* e *S. typhimurium* (Eriksson et al., 2003).

Outro motivo encontrado, durante as análises das proteínas do pVCM04, foi o denominado sítio de ligação do ATP e GTP localizado na proteína RepB. Este sítio possui

uma característica específica de apresentar repetições invertidas e contem uma estrutura de haste em forma de loop semelhante à família dso do pGI3; a possível origem única de replicação da fita (ssoA) também costuma ser encontrada dentro desta região. Esta região sso contém uma estrutura imperfeita de haste em forma de laço, e tem cinco dos seis nucleotídeos conservados (aAGCGA), ela está localizada dentro do loop tipo ssoA (Khan, 1997; Khan, 2000).

Pesquisas também evidenciam a presença de ZL que normalmente encontra-se na região da proteína replicase, porém, no pVCM04 apareceu em uma região da proteína MobB, portanto, não foi encontrado nenhuma outra descrição do ZL em MobB em outros plasmídeos, porém, a literatura descreve importantes motivos de leucina em proteínas RepA e RepB. Análises indicam que monômeros da RepA se ligam a interons da origem de replicação onde dímeros de proteína se ligam a região promotora da RepA, apontando a relevância funcional de duas formas da proteína RepA. Resultados similares têm sido obtidos com proteínas RepA do plasmídeo pSC101 (Ingmer, Fong e cohen, 1995).

Análises genéticas revelaram que motivos de ligação para o zipper de leucina foram encontrados em outras proteínas Rep e têm um papel relevante. Foram realizados experimentos induzindo uma mutação que afeta a região de ligação do ZL da proteína iniciadora R6K resultando em uma proteína com deficiência de atividade na origem de replicação (Miron, Mukherjee e Bastia, 1992).

A estrutura da proteína RepB também sugere um arranjo com o modelo para o ZL, o qual pode estar envolvido na dimerização proteica (Giraldo et al., 1989). O gene que codifica uma proteína RepB de 386 aminoácidos, possui uma sequência com alto grau de identidade para com o iniciador da proteína RepB, de plasmídeo presente em bactéria lactococcal, este plasmídeo apresenta replicação do tipo theta. Como muitos iniciadores de replicação, um motivo foi localizado na região N- terminal da RepB, entre as posições 31 a 45, a qual pode formar uma estrutura em alfa hélice anfipática, com um composto de resíduos de leucina e metionina de repetições periódicas, indicando o local onde pode ser inserido o ZL (Landschultz, Johnson e Mcknight, 1988).

4.14- Análise da estabilidade plasmidial

Como o plasmídeo pVCM04 não apresenta uma marca se seleção para realizar o estudo de estabilidade plasmidial, foi utilizado o plasmídeo híbrido pVCM04/pUC18. Como controle foi utilizado o plasmídeo pLK39 (que contém o gene de resistência a kanamicina), o qual é mantido estável em células de *E. coli*, mesmo sem pressão seletiva o plasmídeo pUC18 é instável. A figura 16 mostra o percentual de células que mantiveram o plasmídeo sem a pressão seletiva.

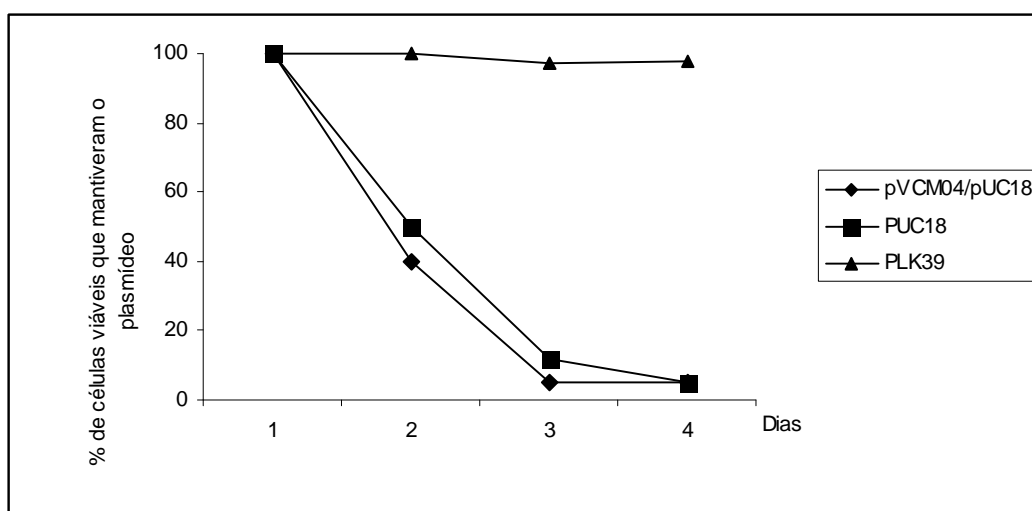


Figura 16 – Análise da estabilidade do plasmídeo pVCM04 em células de *E. coli*, através da comparação do número de células obtidas em meio sólido com e sem antibiótico.

Logo após o primeiro dia de incubação sem pressão seletiva, aproximadamente 50% das células perderam o plasmídeo pUC18 e 60% perderam a fusão pVCM04/pUC18, entretanto, aproximadamente 98% das células mantiveram o pLK39. Os dados sugerem que o pVCM04 é instável em células de *E. coli*. Tal instabilidade pode ser uma característica do próprio pVCM04 ou pode ser justificada pelo fato do gene codificante da enzima replicase no pVCM04 ter sido interrompido quando subclonado no pUC18. Para caracterização correta é necessário desenvolver um derivado do pVCM04 que contenha um gene que codifique resistência a um antibiótico e que seja inserido em um local do pVCM04 que não interrompa os genes presentes que conferem a capacidade de auto-replicação no pVCM04.

Foi realizado um teste de estabilidade com os plasmídeos pAK1, pCGLS-1 e pXEN-1, localizados em *S. Typhimurium*. O teste foi realizado sob pressão seletiva com ampicilina

por um período de seis dias. Ao final do experimento, foi demonstrado que as amostras de *S. Typhimurium* mantiveram os plasmídeos numa concentração entre 10^{-3} e 10^{-5} UFC/mL. Estes resultados confirmam uma boa estabilidade plasmidial (Moulton et al., 2009).

4.15- Conjugação

Para avaliar a eficiência da conjugação entre a bactéria doadora *E. coli* DH5 α (lac Z negativa) e a bactéria receptora *E. coli* HB101 (lac Z positiva), as colônias azuis que abrigavam o pVCM04 foram contadas e comparadas com as colônias brancas. A contagem foi realizada em meio de cultivo com presença e ausência do antibiótico ampicilina. Os resultados obtidos (dados não mostrados) revelaram que não houve conjugação plasmidial eficiente, pois cresceram colônias azuis no meio cultivado sem antibiótico e não cresceram colônias azuis na presença do antibiótico.

Os dados encontrados no presente estudo podem ser justificados pela interrupção do gene codificante para a proteína replicase. Ao ser subclonado no pUC18, estratégia utilizada para iniciar o sequenciamento plasmidial, o pVCM04 foi digerido com a enzima *EcoRI*, cujo sítio de restrição se encontra no meio do gene codificante para a proteína replicase. Dessa forma pode ter sido impedida a expressão da Rep no pVCM04, dificultando o processo de conjugação plasmidial.

Os resultados encontrados neste trabalho podem ser comparados com os divulgados por Chen et al., (2009), os quais analisaram que a eficiência de conjugação plasmidial foi baixa, em torno de 10^{-6} a 10^{-8} UFC/mL. Ao promoverem mutações em um gene de transposon e comparar com o controle positivo, os genes mutados apresentavam uma conjugação em torno de 10^{-2} UFC/mL, demonstrando uma baixa eficiência plasmidial de transferência.

CONCLUSÃO

“A estratégia sem tática é o caminho mais lento para a vitória. Tática sem estratégia é o ruído antes da vitória” (Sun Tzu).

5- CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho indicam que o plasmídeo pVCM04 é pequeno, estimado em 3583 pb. Por meio do sequenciamento obtido, constatou-se que o pVCM04 possui poucos genes, que estão identificados como codificantes para proteínas replicases e proteínas de mobilização. Esses genes que codificam para as replicases e proteínas de mobilização evidenciam a capacidade de autorreplicação plasmidial e uma possível capacidade de transferência. Análises evidenciam que o pVCM04 apresenta uma OriV (origem de replicação), localizada entre os nucleotídeos 352 e 441, apresentando sequência rica em bases AT e duas repetidas em “tandem”. Baseado em dados da literatura, sugerimos que o pVCM04 apresenta replicação do tipo theta.

Os genes de mobilização correspondem à família relaxossoma que são diretamente ligadas ao processo de transferência. O plasmídeo em estudo apresenta três genes importantes para mobilização, denominados: MobA, MobB e MobC. Como demonstrado pelas análises de conjugação com pVCM04 realizadas neste estudo, entre as bactérias *E. coli* DH5 α e *E. coli* HB101, ficou evidente que o pVCM04 não possui uma capacidade de transferência eficiente. Outro dado encontrado foi de que o gene codificante para a proteína MobC do pVCM04 apresentou motivo conservado para esta proteína em outros plasmídeos previamente descritos, esses dados confirmam que a proteína MobC do pVCM04 pertence à família das relaxases.

Outros dados confirmados são de que foram encontrados sítios de ligação para cAMP, ATP e GTP e ZL nas sequências traduzidas das proteínas RepA, RepB, MobA e MobB.

PERSPECTIVAS

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar” (Anatole France).

6 - PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos as perspectivas deste estudo são:

- 1- Estudar a estabilidade do pVCM04 sem estar em fusão com o pUC18;
- 2- Clonar o gene que caracteriza uma marca de seleção no plasmídeo original;
- 3- Avaliar o pVCM04 como provável vetor de expressão para uma proteína recombinante.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias” (Platão).

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles AL, Brendler T, Austin SJ. 1993. Evidence of two levels of control of P1 oriR and host OriC replication origins by DNA adenine methylation. *J. Bacteriol.* 175, 7801–7807.

Almeida Filho ES, Sampaio SCO, Borges NF, Delmondes, EC, Ozaki AS, Souza LC. 2003. Pesquisa de *Salmonella* sp. Em carcaças de frango (*Gallus gallus*), comercializados em feiras livres ou em supermercados no município de Cuiabá - MT - Brasil. *Higiene Alimentar.* 17 (110): 74-79.

Altschul S, Madden T, Schaffer A, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–402.

Astill DS, Manning PA, Heuzenroeder MW. 1993. Characterization of the small cryptic plasmid, pIMVS1, of *Salmonella enterica* ser. typhimurium. *Plasmid.* 30: 258-267.

Azevedo JL. 1998. Genética de microrganismos. 232-235.

Baker S e Dougan G. 2007. The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis.* 45 (1): S29– S33.

Barnes HJ e Gross BW. 1997. Colibacillosis, p. 131–141. In Calnek BW (ed.), *Diseases of poultry*, 10th ed. Iowa State University Press, Ames. *enterica* serovar Typhi isolates. *Journal Clinical Microbiology.* 41: 3823–3828.

Becker EC e Meyer R. 2002. MobA, the DNA strand transferase of plasmid R1162. The minimal domain required for DNA processing at the origin of transfer. *J. Biol. Chem.* 277, 14575–14580.

Bernardi A e Bernardi F. 1984. Complete sequence of pSC101. *Nucleic Acids Res.* 12: 9415 - 9426.

Bhattacharjee M, Rao XM, Meyer RJ. 1992. Role of the origin of transfer in termination of strand transfer during bacterial conjugation. *J. Bacteriol.* 174: 6659–6665.

Borch E, Nesbakken T, Christensen, H. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30(1/2):9-25.

Botsford JL e Harman JG. 1992. Cyclic AMP in Procaryotes. *Microbiol Rev.* 56: 100-122.

Boyd EF, Porwollik S, Blackmer F, McClelland M. 2003. Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3823–3828.

Brasch MA e Meyer RJ. 1987. A 38 base-pair segment of DNA is required in cis for conjugative mobilization of broad host-range plasmid R1162. *J. Mol. Biol.* 198, 361–369.

Byrd DR e Matson SW. 1997. Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol. Microbiol.* 25, 1011–1022.

Caryl, J.A. Smith, M.C.A e Thomas, C.D. 2004. Reconstitution of a staphylococcal plasmid–protein relaxation complex in vitro. *J. Bacteriol.* 186, 3374–3383.

Caryl, J.A. e Thomas, C.D., 2006. Investigating the basis of substrate recognition in the pC221 relaxosome. *Mol. Microbiol.* 60, 1302–1318.

Carvalho CFB e Cortez ALL. 2005. *Samonella* sp em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. *Ciência Rural Santa Maria.* 35 (6): 1465-1468.

Caudry SD e Stanisich VA. 1979. Incidence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* associated with frozen chicken carcasses and characterization of conjugative R plasmids derived from such strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 701–709.

Chadfield MS, Brown DJ, Aabo S, Christensen JP, Olsen JE. 2003. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host adapted *Salmonella enterica* serotypes in the avian host. *Vet Microbiol.* 92: 49-64.

Chattoraj, DK e Schneider, TD. 1997. Replication control of plasmid P1 and its host chromosome: the common ground. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 57: 145–186.

Chen CL, Wang CY, Chu C, Su LH e Chiu CH. 2009. Functional and molecular characterization of pSE34 encoding a type IV secretion system in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 34. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57: 274–283.

Chen CY, Strobaugh Jr TP e Frye JG. 2010. Characterization of small ColE1-like plasmids conferring kanamycin resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. *Plasmid.* 63: 3, 150-154.

Chiu CH, Lin TY e Ou JT. 2000. Lack of evidence of an association between the carriage of virulence plasmid and the bacteremia of *Salmonella typhimurium* in humans. *Microbiol Immunol* 44: 741–748.

Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yeh CM, Weill FX, Chu C. 2006. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2354–8.

Cieślińska H, Werbowya K, Kura J, Turkiewicz M. 2008. Molecular characterization of a cryptic plasmid from the psychrotrophic antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 643A. *Plasmid* 60 (2): 154-158.

Clewell DB. 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid* 58: 205–227.

Coburn PS, Baghdayan AS, Dolan GT e Shankar N. 2007. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol* 63: 530–544.

Craven SE, Stern NJ, Line E, Bailey JS, Cox NA, Fedorka-Cray P. 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* sp. *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* 44:715–720.

D'Aoust JY. *Salmonella*. In: Lund BM., Baird-Parker TC e Gould GW. 2000. editors. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland: Aspen Publishers. p. 1233-1299.

Davies RH, Nicholas RA, McLaren IM, Corkish JD, Lanning DG, Wray C. 1997. Bacteriological and serological investigation of persistent *Salmonella enteritidis* infection in an integrated poultry organisation. *Vet. Microbiol.* 58: 277–293.

Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–464.

Eckdahl TT e Anderson JN. 1990. Conserved DNA structures in origins of replication. *Nucleic Acids Res.* 18, 1609–1612.

Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 47: 103-118.

Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A. 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 235 – 238.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: na approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.

Fernandes AS, Ghilardi ACR, Tavechio AT, Machado AMO, Pignatari CC. 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella enteritidis* strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 45 (2): 59-63.

Fernaández-Tresguerres ME, Martí n M, Viedma GD, Giraldo R e Dí az-Orejas R. 1995. Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J. Bacteriol.* 177: 4377–4384.

Fierer J, Krause M, Tauxe R, Guiney D. 1992. *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *The journal of infections diseases.* 166: 639-642.

Fierer J, Eckann L, Fang F, Pfeifer C, Finlay BB, Guiney D. 1993. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvC* in cultured macrophages and nonphagocytic cell. *Infection and immunity;* 61 (12):5231-5236.

Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? 2005. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 43: 1–11.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 1992. *Bacteriological Analytical Manual.* Arlington. Association of Official Analytical Chemists, 7.ed..

Forster RD e Mead GC. 1976. Effect of temperature and added polyphosphate on the survival of salmonellae in poultry meat during cold storage. *J. Appl. Bacteriol.* 41: 504-510.

Francia, MV.; Varsaki, A; Garcillán-Barcia MP; Latorre A.; Drainas C; de la Cruz F. 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 79–100.

Francia MV e Clewell DB. 2002. Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 *nic* site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Mol Microbiol* 45: 375–395.

Franco BDGM. 2003. Foodborne diseases in Southern South América. In: Miliotis MD e Bier JW. *International handbook of foodborne pathogens*. Marcell Decker. p. 733-743.

Fu Y, Tsai MM, Luo Y, Deonier R, 1991. Deletion analysis of the F plasmid *OriT* locus. *J. Bacteriol.* 173, 1012– 020.

Fu JF, Chang HC, Chen YM, Chang YS, Liu ST. 1995. Sequence analysis of an *Erwinia stewartii* plasmid, pSW100. *Plasmid.* 34, 75.84.

Furuya N, Nisioka T e Komano T. 1991. Nucleotide sequence and functions of the *oriT* operon in IncII plasmid R64. *J Bacteriol.* 173 (7): 2231-2237

Fuzihara TO, Fernandes AF, Franco BDGM. 2000. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection.* 63, 1749-1753.

Gao Q, Luo Y, Deonier RC. 1994. Initiation and termination of DNA transfer at F plasmid *OriT*. *Mol. Microbiol.* 11: 449–458.

Gatto AJ, Peters TM, Green J, Fisher IS, Gill ON, O'brien SJ, Maguire C, Berghold C, Lederer I, Gerner-Smidt P, Torpdahl M, Siitonen A, Lukinmaa S, Tschäpe H, Prager R, Luzzi I, Dionisi AM, VAN DER Zwaluw WK, Heck M, Coia J, Brown D, Usera M, Echeita A, Threlfall EJ. 2006. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000–2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiol Infect.*25:1–8.

Ghosh A, Singh A, Ramteke PW, Singh VP. 2000. Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 6–11.

Giraldo R, JAndreu JM e Díaz-Orejas R. 1998. Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *The EMBO Journal.* 17 (15): 4511–4526.

Giraldo R, Nieto C, Fernandez-Tresguerres ME e Diaz R. 1989. Bacterial zipper. *Nature* 342: 866.

Gregorova D, Pravcova M, Karpiskova R, Rychlik I. 2002. Plasmid pC present in *Salmonella enterica* serovar enteritidis PT14b strains encodes a restriction modification system. *FEMS Microbiol. Lett.* 214: 195.

Gregorova D, Matiasovicova J, Sebkova A, Faldynova M, Rychlik I. 2004. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar enteritidis harbours ColE1, ColE2, and rollingcircle- like replicating plasmids. *Can. J. Microbiol.* 50: 107- 112.

Guard-Petter J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. Minireview. *Environmental Microbiology.* 3 (7): 421 – 430.

Guerra B, Soto S, Helmuth R e Mendoza MC. 2002. Characterization of a selftransferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 2977–2981.

Guerry P, Van Embden J e Falkow S. 1999. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. *Journal of bacteriology.* 117(2):619-30.

Guimarães V, Innocentin S, Chatel JM, Lefèvre F, Langella P, Azevedo V e Miyoshi A. 2009. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy*. 7: 4, 1-7.

Guiney DG, Libby S, Fang FC, Krause M, Fierer J. 1995. Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in salmonella. *Trends in microbiology*. 3 (7): 275-279.

Haake SK, Wang X. 1997. Cloning and expression of FomA, the major outer-membrane protein gene from *Fusobacterium nucleatum* T18. *Arch. Oral Biol*. 42, 19–24.

Hall RM e Collis CM. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol*. 15, 593–600.

Haneda T, Okada N, Miki T, Danbara H. 2004. Sequence analysis and characterization of sulfonamide resistance plasmid pRF-1 from *Salmonella enterica* serovar choleraesuis. *Plasmid*. 52, 218–224.

Haring V e Scherzinger E. 1989. Replication proteins of the IncQ plasmid RSF1010. In: Thomas, C.M. (Ed.), *Promiscuous Plasmids of Gramnegative Bacteria*. Academic Press, London. 95–124.

Hays JP, Eadie K, Verduin CM, Verbrugh H, van Belkum A. 2005. A novel plasmid (pEMCJH03) isolated from *Moraxella catarrhalis* possibly useful as a cloning and expression vector within this species. *Plasmid*. 53, 263–268.

Helmuth R e Schroeter A. 1994. Molecular typing methods for *S. enteritidis*. *Int J food Microbiol*. 21, 69-77.

Hiraga, S., T. Sugiyama, T. Itoh. 1994. Comparative analysis of the replicon regions of eleven ColE2-related plasmids. *J. Bacteriol*. 176:7233– 7243.

Hirsh, D.C. 2003. Salmonella. In: Microbiologia Veterinária. Hirsh, D.C. e Zee, Y.C. Pp. 69-73. Guanabara Koogan Rio de Janeiro, Brasil.

Hoffer E e Reis EMF. 1994. Salmonella serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. Revta Inst. Med. Trop. 36, 7-9.

Humphrey TJ, Mead GC, Rowe B. 1988. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epidemiol. Infect. 100, 175–184.

Ibanez M e Rotger R. 1993. Characterization of a small cryptic plasmid from Salmonella enteritidis that affects the growth of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 109, 225-229.

Ilyina TV e Koonin EV, 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. Nucleic Acids Res. 20, 3279–3285.

Ingmer H, Fong EL e Cohen SN. 1995. Monomer-dimer equilibrium of the pSC101 RepA protein. J. Mol. Biol. 250: 309–314.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency of *Escherichia coli* With plasmids. Gene. Amsterdam. 96 (1): 23-8.

Inui M, Nakata K, Roh JH, Verté's AA, e Yukawa H. 2003. Isolation and Molecular Characterization of pMG160, a Mobilizable Cryptic Plasmid from *Rhodobacter blasticus*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 69 (2): 725–733.

Itoh T e Horii T. 1989. Replication of ColE2 and ColE3 plasmids: in vitro replication dependent on plasmid-coded proteins. Mol. Gen. Genet. 219: 249–255.

Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA. 2003. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. Mol Biol Evol. 20, 1598–1602.

Jay JM. 2005. Microbiologia de alimentos. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed.

Kang SW, Kuzuhara T, Horikoshi M. 2000. Genes Cells 5: 251–263.

Karpathy SE, Qin X, Gioia J, Jiang H, Liu Y, Petrosino JF, Yerrapragada S, Fox GE, Haake SK, Weinstock GM, Highlander SK. 2007. Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* subspecies *polymorphum* – a genetically tractable fusobacterium. PLoS One 2, e659.

Keenleyside WJ e Whitfield C. 1995. Lateral transfer of *rfb* genes: a mobilizable ColE1-type plasmid carries the *rfbO*:5 4 (O:54 antigen biosynthesis) gene cluster from *Salmonella enterica* serovar Borreze. J. Bacteriol. 177, 5247.5253.

Kelly SM, Bosecker BA, Curtiss R III. 1992. Characterization and protective properties of attenuated mutants of *Salmonella choleraesuis*. Infect Immun. 60: 4881-4890.

Kelman Z e O'Donnell M. 1995. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. Annu. Rev. Biochem. 64, 171–200.

Kennedy MJ, Yancey RJ Jr, Sanchez MS, Rzepkowski RA, Kelly SM, Curtiss R. 1999. 3rd: Attenuation and immunogenicity of $\Delta cya \Delta crp$ derivatives of *Salmonella choleraesuis* in pigs. Infect Immun. 67: 4628-4636.

Khan AS. 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 442.455.

Khan, S.A. 2000. Plasmid rolling-circle replication: recent developments. Mol. Microbiol. 37: 477–484.

Kich JD, Piffer IA, Colde Bella A, Amaral A, Ramminger L, Cardoso M. 2005. Fatores associados a soro prevalência de Salmonella em rebanhos comerciais de suínos. *Ciência Rural em Santa Maria*. 35 (2): 398 - 405.

Kim K e Meyer RJ. 1989. Unidirectional transfer of broad host-range plasmid R1162 during conjugative mobilization. Evidence for genetically distinct events at OriT. *J. Mol. Biol.* 208, 501–505.

Kinde H, Adelson M, Ardans A, Little EH, Willoughby D, Berchtold D, Read DH, Breitmeyer H, Kerr D, Tarbell R, Hughes E. 1997. Prevalence of Salmonella in municipal sewage treatment plant effluents in Southern California. *Avian Dis.* 41, 392–398.

Haake KS, Yoder S, Gerardo SH. 2006. Efficient gene transfer and targeted mutagenesis in *Fusobacterium nucleatum*. *Plasmid* 55, 27–38.

Koh CL e Kok CH. 1984. Antimicrobial resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from animals in peninsular Malaysia. *Southeast Asian Trop. Med. Public Health.* 1, 37–43.

Kornberg A e Baker TA. 1992. DNA replication, 2nd ed. Freeman and Company, New York, N.Y.

Kozlowski M, Thatte V, Lau PCK, Visentin LP e Iyer VN. 1987. Isolation and structure of the replicon of the promiscuous plasmid pCU1. *Gene* 58: 217–228.

Landschultz WH, Johnson PF e Mcknight SL. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759–1764.

Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91, 73–84.

Le Minor L. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR e Holt JG. 1984. (eds.). Williams e Wilkins Co., Baltimore. 1, p. 427-458.

Levy SB, Fitzgerald GB, Macone AB, 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*. 260:40-42.

Lewin B. 2001. Genes VII. Porto Alegre: Artmed, p. 960.

Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF e Wang JT. 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol* 190: 515-526.

Majtan V, Majtan T, Majtan J, Monika S, Lubica M. 2006. *Salmonella enterica* serovar Kentucky: antimicrobial resistance and molecular analysis of clinical isolates from the Slovak Republic. *Jpn J Infect Dis*. 59, 358-62.

Marchler-Bauer A., Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Fu Lu, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Marchler e Bauer et al., 2009 L. 2009. Genome acquisition in horizontal gene transfer: ymbiogenesis and macromolecular sequence analysis. *Methods Mol Biol*.532: 181-91.

Matson, S., Nelson, W., Morton, B., 1993. Characterization of the reaction product of the *oriT* nicking reaction catalyzed by *Escherichia coli* DNA helicase I. *J. Bacteriol*. 175, 2599-2606.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 5 (5): 607-625.

Mendes PVC. 2008. Isolamento e caracterização de um plasmídeo extraído de salmonella sp isolada de carcaças de frangos abatidos em frigorífico fiscalizado pelo serviço de inspeção federal no município de Rio Verde – GO. Dissertação de mestrado defendida em março de 2008 pela Universidade Federal de Goiás.

Meyer, R. 2009. Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* 62: 57–70.

Miron A, Mukherjee S e Bastia D. 1992. Activation of distant replication origins in vivo by DNA looping as revealed by a novel mutant form of an initiator protein defective in cooperativity at a distance. *EMBO J.* 11:1205–1206.

Mishu B, Koehler J, Lee LA, Rodrigue D, Brenner FH, Blake P, Tauxe RV. 1994. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985–1991. *J. Infect. Dis.* 169, 547–552.

Miyahara M, Ishiwata N, Yoshida Y. 1997. Sty D4I restriction- modification system of *Salmonella typhi* D4: cloning and sequence analysis. *Biol. Pharm. Bull.* 20, 201 - 203.

Monzingo A, Ozburn A, Xia S, Meyer R, Robertus J. 2007. The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 366: 165–178.

Moulton K, Ryan P, Lay D e Willard S. 2009. Photonic plasmid stability of transformed *Salmonella Typhimurium*: A comparison of three unique plasmids *BMC Microbiology.* 9: 152, 1-7.

Mruk I, Sektas M, Kaczorowski T. 2001. Characterization of pEC156, a ColE1-type plasmid from *Escherichia coli* E1585-68 that carries genes of the EcoVIII restriction-modification system. *Plasmid.* 46: 128 - 139.

Nelson WC, Howard MT, Sherman JA, Matson SW. 1995. The *traY* gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid OriT. *J. Biol. Chem.* 270, 28374–28380.

Nieto C, Giraldo R, Fernandez-Tresguerres E e Díaz R. 1992. Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* pathovar *savastanoi*. *J. Mol. Biol.* 223: 415–426.

Noirot-Gros M, Bidnenko V, Ehrlich S. 1994. Active site of the replication protein of the rolling circle plasmid pC194. *EMBO J.* 13: 4412–4420.

Nunez B e de la Cruz F. 2001. Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Mol Microbiol* 39: 1088–1099.

Olusesan AG, Nonyelum O, Ebere OCL e Olorunmola EJ. 2010. Plasmid DNA analysis and conjugative study of antibiotic resistant *Salmonella typhi* and *paratyphi* to ten selected antibiotics in Zaria, Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 4(4): 151-157.

Olsen SJ, Bleasdales SC, Magnano AR, Landrigan C, Holland BH, Tauxe RV, Mintz ED, Luby S. 2003. Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960-99. *Epidemiology and Infection* 130:13-21.

Olsen AR e Hammack TS. 2000. Isolation of *Salmonella* sp. From the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. *J. Food Protect.* 63, 958–960.

Ou JT, Baron LS, Dai XY, Life CA. 1990. The virulence plasmids of *Salmonella* serovars typhimurium, choleraesuis, dublin, and enteritidis, and the cryptic plasmids of *Salmonella* serovars Copenhagen and sendai belong to the same incompatibility group, but not those of

Salmonella serovars durban, gallinarum, give, infantis and pullorum. Microb. Pathog. 8, 101–107.

Ou JT. 1993. The 90 kilobase pair virulence plasmid of Salmonella serovar typhimurium coexists in strains with a plasmid of the 23 incompatibility groups. Microb. Pathog. 15, 237–242.

Pacek M., Konopa, G. e Konieczny, I. 2001. DnaA box sequences as the site for helicase delivery during plasmid RK2 replication initiation in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 230: 540- 546.

Pansegrau W, Lanka E, Barth PT, Figurski DH, Guiney DG, Haas D, Helinski DR, Schwab H, Stanisich VA e Thomas CM. 1995. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. J. Mol. Biol. 239: 623–663.

Parker C, Becker E, Zhang X, Jandle S, Meyer R. 2005. Elements in the co-evolution of relaxases and their origins of transfer. Plasmid. 53, 113–118.

Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. Nature. 389, 801–802.

Perwez T e Meyer R. 1999. Stabilization of the relaxosome and stimulation of conjugal transfer are genetically distinct functions of the R1162 protein MobB. J Bacteriol 181: 2124–2131.

Picollo RC, Pimentel EP, Fávero LM, Rizzo MA, Pascher DM. 1992. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo em 1991. Higiene Alimentar. 6 (23): 28-30.

Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2002. (n° 46) to the Kauffmann-White scheme. 2004. Research in Microbiology. 155: 568- 570.

Reece RJ. 2004. Analysis of genes and genomes. Cap.1, Structure and function. University of Manchester, UK. Editora Jonh Wiley e Sons Ltd. 4ª Edição.

Ridley AM, Punia P, Ward LR, Rowe B, Threlfall EJ. 1996. Plasmid characterization and pulsed-field electrophoretic analysis demonstrate that ampicillin-resistant strains of *Salmonella enteritidis* phage type 6a are derived from *S. enteritidis* phage type 4. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 613–618.

Rodrigue DC, Taux RV, Rowe B. 1990. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new endemic. *Epidemiol Infection.* 105, 21-27.

Rost B, Fariselli P e Casadio R. 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* 5: 1704–1718.

Roy C e Isberg R. 1997. Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect Immun* 65: 571–578.

Roudier C, Fierer J, Guiney DG. 1992. Characterization of translation termination mutations in the *spv* operon of the salmonella virulence plasmids *psd12*. *Journal of bacteriology.* 174 (20): 6418-6423.

Rychlik I, Karpiskova R, Faldynova M, Sisak F. 1998. Computer-assisted restriction endonuclease analysis of plasmid DNA in field strains of *Salmonella enteritidis*. *Can. J. Microbiol.* 44, 1183- 1185.

Rychlik I, Sebkova A, Gregorova D, Karpiskova R. 2001. Low-molecular-weight plasmid of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* codes for retron reverse transcriptase and influences phage resistance. *J. Bacteriol.* 183, 2852 - 2858.

Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. Review. Vet Microbiol. 112, 1–10.

Saitou N e Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

Sajid SU, Schwarz S. 2009. Plasmid fingerprinting and virulence gene detection Among indigenous strains of *salmonella enterica* Serovar enteritidis. J ayub med coll abbotabad. 21: 2.

Sambrook PH, Fritsh EF, Maniats T. Molecular Cloning. 1989– A Laboratory Manual. 2 ED. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scherzinger E, Lurz R, Otto S, Dobrinski B. 1992. In vitro cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. Nucleic Acids Res. 20: 41–8.

Schlosser WD, Henzler DJ, Mason J, Kradel D, Shipman L, Trock S, Hurd SH, Hogue AT, Sisco W and Ebel ED. 1999. The *Salmonella enterica* serovar enteritidis pilot project. In: *Salmonella enterica* serovar enteritidis in humans and animals. Epidemiology, pathogenesis, and control. Saeed AM, Gast RK, Potter ME, and Wall PG, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 353–365.

Schroeder CM, White DG and Meng JH. 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. Food Microbiol. 21, 249–255.

Schubert S, Dufke S, Sorsa J e Heesemann J. 2004. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. Mol Microbiol 51: 837–848.

Shinohara M e Itoh T. 1996. Specificity determinants in interaction of the initiator (Rep) proteins with the origins in the plasmids ColE2-P9 and ColE3-CA38 identified by chimera analysis. *J. Mol. Biol.* 257: 290–300.

Silva, MCD, Santos LR, Teixeira FE. 2004. Salmonella sp. Em ovos e carcaças de frangos "in natura" comercializados em Maceió-AL. *Higiene Alimentar.* 18 (121): 80-8.

Smith, M.C., Thomas, C.D., 2004. An accessory protein is required for relaxosome formation by small staphylococcal plasmids. *J. Bacteriol.* 186, 3363–3373.

Solar G e Espinosa M. 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Molecular microbiology.* 37 (3): 492-500.

Stanley J, GoldsworthyM, Threlfall EJ. 1992. Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of Salmonella enteritidis. *FEMS Microbiol Lett.* 90, 153–60.

Summers DK e sherrat DJ. 1984. Multimerization of high cop Y number plasmids causes instability: colE 1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell.* 36: 1097 – 1103.

Tait RC, Kado CI e Rodriguez RL. 1983. A comparison of the origin of replication of pSa with R6K. *Mol. Gen. Genet.* 192: 32–38.

Takechi S, e Itoh T. 1995. Initiation of unidirectional ColE2 DNA replication by a unique priming mechanism. *Nucleic Acids Res.* 23: 4196–4201.

Takechi S, Matsui H e Itoh T. 1995. Primer RNA synthesis by plasmidspecified Rep protein for initiation of ColE2 DNA replication. *EMBO J.* 14: 5141–5147.

Tauxe RV. 1991. Salmonella: A postmodern pathogen. *J. Food Prot.* 54, 563–568.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Plewniak R, Jeanmougin F. 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2: 4876–4882.

Threlfall EJ. 2000. Genetic studies of multiple drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 46, 7–10.

Threlfall EJ, Frost J, Ward L. 1996. Increasing spectrum of resistance in multi-resistant *Salmonella typhimurium*. *Lancet.* 347 (9007): 1053–4.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2005. *Microbiologia.* 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, p.894.

Tosini F, Visca P, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A. 1998. Class 1 integron-borne multiple antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 3053–8.

Tuohy K, Davies M, Rumsby P, Rumney C, Adams MR and Rowland IR. 2002. Monitoring transfer of recombinant and nonrecombinant plasmids between *Lactococcus lactis* strains and members of the human gastrointestinal microbiota in vivo – impact of donor cell number and diet. *J Appl Microbiol.* 93, 954–964.

Uzzau S, Marogna G, Leori G, Curtiss R III, Schianchi GBA, Stocker P, Cappuccinelli S, Rubino S. 2005. Virulence attenuation and vaccine potential of *aroA*, *crp-cya*, and plasmid cured mutants of *Salmonella Abortusovis* in the mice and sheep model. *Infect Immun.* 73: 4302-4308.

Van der Wolf PJ, Wolbersa WB, Elbersa ARW, Van der Heijdenb HMJF, Koppena JMCC, Hunnemana WA, Van Schiea FW, Tielena MJM. 2001. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in nishing pig herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology.* 78, 205-19.

Varnan AH e Evans MG. 1991. Foodborne Pathogens an illustrated text. Wolfe Publishing Ltda, Aylesbury, England, cap. 4, p. 51-85.

Varsaki A, Lucas M, Afendra AS, Drainas C, De La Cruz F., 2003. Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization. *Mol. Microbiol.* 48: 481–493.

Varsaki, A. et al, 2009. Analysis of ColE1 MbeC unveils an extended ribbon-helix–helix family of nicking accessory proteins. *J. Bacteriol.* 191, 1446–1455.

Veldman A, Vahl HA, Borggreve GJ, Fuller DC. 1995. A survey of incidence of Salmonella species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Veterinary Record, London.* 136 (7): 169-172.

Wang HH, Manuzon M, Lehman M, Wan K, Luo HL, Wittum TE, Yousef A and Bakaletz LO. 2006. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 254, 255 - 328.

Waters VL. 2001. Conjugation between bacterial and mammalian cells. *nature genetics.* 29: 375-376.

Watson RJ, Vernet T e Visentin LP. 1985. Relationships of the Col plasmids E2, E3, E4, E5, E6, and E7: restriction mapping and colicin gene fusions. *Plasmid* 13:205–210. (Erratum, 14:97).

Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Kenton DL, Khovayko O, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Suzek TO, Tatusov R, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E. 2006. Database resources of the

National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 1: 34 (Database issue): D173-80.

White DG, Zhao SH, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect.* 4, 405–412.

Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R and Meng J. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3483–3489.

Yasueda H, Horii T e Itoh T. 1989. Structural and functional organization of ColE2 and ColE3 replicons. *Mol. Gen. Genet.* 215: 209–216.

Yasukawa H, Hase T, Sakai A and Masamune Y. 1991. Rolling- circle replication of the plasmid pKYM isolated from a gram- negative bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10 - 282 e 10 - 286.

Ye Z, Petrof EO, Boone D, Claud, EC, Sun J. 2007. Salmonella effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination. *Am J Pathol.* 171 (3): 882–892.

Zaha A. 1996. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre, Mercado Aberto. Cap 3, pg. 70.

Zavitz KH and Marians KJ. 1991. Dissecting the functional role of PriA protein-catalyzed primosome assembly in *Escherichia coli* DNA replication. *Mol. Microbiol.* 5, 2869–2873.

Zechner EL, de la Cruz F, Eisenbrandt R, Grahn AM, Koraimann G, Lanka E, Muth G, Pansegrau W, Thomas CM, Wilkins BM, Zatyka M, 2000. Conjugative- DNA transfer processes. In: Thomas, C.M. (Ed.), *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 87–174.

Zhang S e Meyer RJ. 1995. Localized denaturation of OriT DNA within relaxosomes of the broad-host-range plasmid R1162. *Mol. Microbiol.* 17, 727–735.

Zhang X, Kelly SM, Bollen W, Curtiss R III. 1997. Characterization and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* SL1344 and UK- 1 *CRP* and *cdt* deletion mutant. *Infect Immun.* 65: 5381-5387.

Zhang X, Kelly SM, Bollen W, Curtiss R III. 1999. Protection and immune responses induced by attenuated *Salmonella typhimurium* UK-1 strains. *Microb Pathog.* 26: 121-130.

APÊNDICE

Legenda RepA da figura 13A

Plasmídeo	Organismo	GenBank
pSM76_03	<i>S. maltophilia</i>	ABU40767.1
Indefinido	<i>T.intermedia K12</i>	EEU53682.1
Indefinido	<i>P. acidipropionici</i>	BAB17919.1
pAsa3	<i>A. salmonicida</i>	AAP69899.1
pPT1	<i>C. testosteroni</i>	YP_001687748.1
Indefinido	<i>N. lactamica</i>	YP_001688108.1
pEMCJH03	<i>M. catarrhalis</i>	AAO38173.1
Indefinido	<i>P. cryohalolentis K5</i>	ABE76259.1
pKW1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	ACC99587.1
pBD146	<i>V. fluvialis</i>	ACF15553.1
Et1/99	<i>E. tasmaniensis</i>	CAO98282.1

Legenda RepB da figura 13B

Plasmídeo	Organismo	GenBank
pCCK647	<i>P. multocida</i>	CAI57697.1
pNC903	<i>R. ruber</i>	BAE06129.1
pRSG43	Vector pRSG43	BAI39645.1
pKNR01	<i>R. opacus B4</i>	BAD95582.1
pREC2	<i>R. erythropolis PR4</i>	YP_345165.1
pSM76	<i>S. maltophilia</i>	ABU40768.1
pCASE1	<i>C. casei</i>	YP_002000366.1
pCRB26	Vector pCRB26	BAI66096.1
pB264	<i>Rhodococcus sp</i>	AAR85894.1
pNC500	<i>R. rhodochrous</i>	BAF45390.1

Legenda MobA da figura 14A

Plasmídeo	Organismo	GenBank
pAlvA	<i>H. alvei</i>	AAQ21129.1
pSW200	Indefinido	AAA69498.1
pAlvB	<i>H. alvei</i>	YP_025362.1
pYe4449-1	<i>Y.enterocolitica</i>	YP_002643113.1
pSL476_3	<i>S. enterica</i>	YP_002043968.1
pColK-K235	<i>E. coli</i>	YP_214176.1
pColD-157	<i>E. coli</i>	CAA71435.1
pO111_5	<i>E. coli</i>	YP_003237835.1
pSE11-4	<i>E. coli</i>	YP_002291001.1
pWQ799	Indefinido	AAC98398.1

Legenda MobB da figura 14B

Plasmídeo	Organismo	GenBank
pHE1	<i>H. elongata</i>	CAB96960.1
pAsal3	<i>A. salmonicida</i>	NP_710179.1
Indefinido	<i>S. enterica</i>	YP_001468282.1
pAlvA	<i>H. alvei</i>	YP_025357.1
Indefinido	<i>S. enterica</i>	YP_001976179.1
Indefinido	<i>H. alvei</i>	YP_025364.1
pEC3	<i>P. carotovorum</i>	BAA08131.1
Indefinido	Bactéria endofítica	YP_003097656.1
pRK10	<i>S. marcescens</i>	YP_001941151.1
Indefinido	<i>E. coli</i>	YP_002296024.1

Legenda MobC da figura 14C

Plasmídeo	Organismo	GenBank
pSMS35_8	<i>E. coli</i>	YP_001739875.1
ColE1	<i>E. coli</i>	NP_040368.1
pRK2	<i>E. coli</i>	YP_052692.1
pWQ799	Indefinido	AAC98397.1
pSFD10	<i>S. holeraesuis</i>	NP_203137.1
pAlvA	<i>H. alvei</i>	YP_025358.1
pSE11-4	<i>E. coli</i>	YP_002291003.1
pO111_5	<i>E. coli</i>	YP_003237834.1
pAsal3	<i>A. salmonicida</i>	NP_710177.1
pMG828-3	<i>E. coli</i>	ABJ16454.1

Tabela III- Codon usage dos genes que compõe o pVCM04.

Aminoácidos	Codon	RepA	RepB	MobA	MobB	MobC
Ala	GCG	11	4	8	4	4
Ala	GCA	8	2	15	2	2
Ala	GCT	3	0	13	0	0
Ala	GCC	13	5	3	5	5
Cys	TGT	2	1	0	1	1
Cys	TGC	0	0	2	0	0
Asp	GAT	4	3	15	3	3
Asp	GAC	14	5	12	5	5
Glu	GAG	5	1	17	1	1
Glu	GAA	13	4	25	4	4
Phe	TTT	7	2	4	2	2
Phe	TTC	4	0	3	0	0
Gly	GGG	3	2	6	2	2
Gly	GGA	3	0	19	0	0
Gly	GGT	2	2	7	2	2
Gly	GGC	3	0	9	0	0
His	CAT	3	0	2	0	0
His	CAC	8	1	4	1	1
Ile	ATA	7	1	5	1	1
Ile	ATT	5	0	11	0	0
Ile	ATC	4	2	4	2	2
Lys	AAG	7	4	7	4	4
Lys	AAA	5	7	8	7	7
Leu	TTG	3	1	6	1	1
Leu	TTA	3	0	8	0	0
Leu	CTG	15	2	9	2	2
Leu	CTA	7	1	2	1	1
Leu	CTT	3	0	7	0	0
Leu	CTC	2	1	4	1	1
Met	ATG	3	5	10	5	5
Asn	AAT	3	1	6	1	1
Asn	AAC	9	1	6	1	1

Pro	CCG	8	1	5	1	1
Pro	CCA	4	1	7	1	1
Pro	CCT	3	0	7	0	0
Pro	CCC	7	0	4	0	0
Gln	CAG	5	2	14	2	2
Gln	CAA	9	3	7	3	3
Arg	AGG	2	2	7	2	2
Arg	AGA	2	2	8	2	2
Arg	CGG	6	0	8	0	0
Arg	CGA	3	1	17	1	1
Arg	CGT	4	3	8	3	3
Arg	CGC	10	5	8	5	5
Ser	AGT	2	2	6	2	2
Ser	AGC	5	3	18	3	3
Ser	TCG	3	1	4	1	1
Ser	TCA	1	1	3	1	1
Ser	TCT	0	0	2	0	0
Ser	TCC	0	0	6	0	0
Thr	ACG	4	1	5	1	1
Thr	ACA	5	2	8	2	2
Thr	ACT	3	0	2	0	0
Thr	ACC	5	3	5	3	3
Val	GTG	4	0	9	0	0
Val	GTA	3	1	4	1	1
Val	GTT	1	1	11	1	1
Val	GTC	4	3	1	3	3
Trp	TGG	11	1	6	1	1
Tyr	TAT	2	3	6	3	3
Tyr	TAC	7	2	5	2	2
End	TGA	1	0	1	0	0
End	TAG	0	1	0	1	1
End	TAA	0	0	0	0	0
