

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

MATEUS MALDONADO CARRIERO

**Caracterização e análise de expressão dos genes das enzimas Arginase 1, Arginase 2 e
Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) de *Piaractus mesopotamicus* em resposta à
infecção por *Aeromonas dhakensis***

São Carlos, SP

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

MATEUS MALDONADO CARRIERO

Caracterização e análise de expressão dos genes das enzimas Arginase 1, Arginase 2 e Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) de *Piaractus mesopotamicus* em resposta à infecção por *Aeromonas dhakensis*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia

São Carlos, SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C316c Carriero, Mateus Maldonado
 Caracterização e análise de expressão dos genes
das enzimas Arginase 1, Arginase 2 e Óxido Nítrico
Sintase Induzível (iNOS) de *Piaractus mesopotamicus*
em resposta à infecção por *Aeromonas dhakensis* /
Mateus Maldonado Carriero. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
 99 p.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

 1. Peixes. 2. *Piaractus mesopotamicus*. 3.
Patogenia. 4. Expressão gênica. 5. Resposta
imunológica. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Mateus Maldonado Carriero, realizada em 25/02/2016:

Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia
USP

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva
UFSCar

Prof. Dr. Edson Roberto da Silva
USP

Profa. Dra. Fabiana Pilarski
UNESP

Prof. Dr. George Shigueki Yasui
USP

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro Sousa
USP

*Aos meus queridos pais Sônia e Rogério e
à minha namorada Maite pelo apoio
incondicional em todos os momentos, amor,
carinho, sabedoria e compreensão.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Aos meus mestres, meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Silva e co-orientador Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia pela orientação, confiança, paciência e apoio ao longo de todos os anos do meu doutorado.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Souza e técnicas Flávia Munin e Silvia S. M. Godoy pela valiosa colaboração nas análises microbiológicas desse trabalho.
- Aos meus colegas do laboratório de Parasitologia da FZEA/USP, Márcia, Gabriel, Kássia, Juliana, Tiago, Elayna, Julio, Josi, João (Curió) e Hugo pelo convívio, por compartilharem o conhecimento e o aprendizado e pelos bons momentos.
- Aos companheiros do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), Juliano Sangalli (Manfreda), Rafael Sampaio, Paulinho Fantinato, Juliano Silveira (Gaúcho), Tiago de Bem, Pedrinho, Laís, Fabiana (Martini), Prof. Felipe Percin, Prof. Edson, Prof. Flávio Meirelles e muitos outros, que sempre me apoiaram e serviram de inspiração para meu desenvolvimento acadêmico.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.
- A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

Em especial:

- Aos meus pais Sônia e Rogério e a meu irmão Rogério pelo apoio, incentivo, amor e educação fundamentais para a formação do meu caráter e crescimento pessoal e profissional
- À minha querida namorada Maite del Collado, que esteve ao meu lado em todos os momentos, bons e difíceis, ao longo do desenvolvimento desse trabalho, sempre me dando carinho, apoio e incentivo tão fundamentais.
- À nossa cachorrinha de 3 patas mais linda e mimada do mundo, Lia, que deu um colorido todo especial na nossa vida, tornando mais fácil até os momentos mais complicados.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise da expressão dos genes das enzimas Arg1, Arg2 e iNOS no fígado, rim anterior e baço de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em 4 períodos diferentes pós-infecção, em resposta à infecção experimental pela bactéria *Aeromonas dhakensis*. A cepa bacteriana utilizada no presente estudo foi isolada de um exemplar de *P. mesopotamicus* obtido do CEPTA/ICMbio em Pirassununga – SP, caracterizada por testes bioquímicos pelo sistema de identificação automatizado VITEK 2 e identificada como sendo do gênero *Aeromonas*. Posteriores análises moleculares dos genes 16S rRNA, gyrB e rpoD demonstraram que a bactéria isolada era da espécie *A. dhakensis*, cuja ocorrência na América do Sul nunca havia sido relatada. Essa cepa se mostrou resistente aos antibióticos ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina e meropenem, com elevado nível de virulência para pacus experimentalmente infectados, causando sinais clínicos de septicemia hemorrágica aguda. A dose letal para 50% dos animais infectados (DL₅₀) foi de $1,1 \times 10^5$ UFC/peixe. Uma vez caracterizada, essa cepa de *A. dhakensis* foi utilizada no experimento de infecção em *P. mesopotamicus* para análise de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS. Esses genes foram sequenciados e, a partir das sequências parciais, *primers* específicos para *P. mesopotamicus* foram desenhados para as análises de expressão por PCR em tempo real quantitativo (qPCR). O gene Arg1 apresentou os maiores níveis de expressão basal no fígado, já o gene Arg2 foi mais expresso no rim e o gene iNOS apresentou os maiores níveis de expressão basal no rim e no fígado. Após a infecção por *A. dhakensis*, o gene Arg1 apresentou uma leve diminuição na expressão no rim no período de 24 h pós-infecção; o gene Arg2 apresentou uma redução na sua expressão no fígado nos períodos de 12 h e 24 h pós-infecção e um aumento na expressão no baço nos períodos de 24h e 48 h pós-infecção; e o gene iNOS apresentou aumento significativo nos níveis de expressão no baço

nos períodos de 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção. Os resultados do presente trabalho mostram que os genes Arg2 e iNOS foram os que apresentaram maior variação em resposta à infecção por *A. dhakensis*, indicando que estes genes estão envolvidos na resposta inicial à infecções por essa bactéria em *P. mesopotamicus*. O baço foi o órgão mais envolvido nessa resposta, apresentando as maiores variações nos níveis de expressão desses genes após o desafio. Este é o primeiro estudo avaliando os níveis de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS em *P. mesopotamicus* após infecção por *A. dhakensis*, fornecendo uma valiosa contribuição para o entendimento dos mecanismos de resposta imunológica contra patógenos desse importante peixe sul-americano.

Palavras-chave: peixes, *Piaractus mesopotamicus*, patogenicidade, *Aeromonas dhakensis*, qPCR, arginase, iNOS, expressão gênica, resposta imunológica

ABSTRACT

The main goal of the present work was to perform an expression analysis of the Arg1, Arg2 and iNOS genes in the liver, anterior kidney and spleen of *pacu* (*Piaractus mesopotamicus*) in 4 different times post-infection, in response to the experimental infection with the bacterium *Aeromonas dhakensis*. The strain used in the present study was isolated from a specimen of *P. mesopotamicus* from the CEPTA/ICMBio in Pirassununga – SP, characterized by biochemical tests using the VITEK 2 automated identification system, and identified as belonging to the genus *Aeromonas*. Further molecular analyses of the 16S rRNA, gyrB and rpoD genes showed that the isolated strain belonged to the species *A. dhakensis*, a species that had never been reported in South America. This strain was resistant to the antibiotics ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftiofur and meropenem, with a high virulence level against experimentally infected *pacus*, causing clinical signs of acute hemorrhagic septicemia. The fifty per cent lethal dose (LD₅₀) was 1.1×10^5 CFU/fish. Once characterized, this *A. dhakensis* strain was used in the infection experiments in *P. mesopotamicus* in order to analyze the expression of the Arg1, Arg2 and iNOS genes. These genes were sequenced and, from the partial sequences, *P. mesopotamicus* specific primers were designed for the quantitative real time PCR (qPCR) expression analyses. Following the infection with *A. dhakensis*, the Arg1 gene expression levels decreased in the kidney 24 h post-infection; the Arg2 gene expression of reduced in the liver at 12 h and 24 h post-infection and increased in the spleen at 24 h and 48 h post-infection; the gene expression of iNOS was significantly increased in the spleen at 12 h, 24 h, and 48 h post-infection. The results of the present study showed that the Arg2 and iNOS genes were the most variable in response to the *A. dhakensis* infection, indicating that these are involved in the initial immune response to bacterial infections in *P. mesopotamicus*. The organ that was most involved in this response was the spleen, which showed the highest levels of variation in these genes after the challenge. This is

the first study assessing the expression levels of the Arg1, Arg2 and iNOS genes in *P. mesopotamicus* following the infection with *A. dhakensis*, providing a valuable contribution for the understanding of the immune response mechanisms against bacterial pathogens in this important South American fish species.

Keywords: fish, *Piaractus mesopotamicus*, pathogeny, *Aeromonas dhakensis*, qPCR, arginase, iNOS, gene expression, immune response

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Alinhamento de sequências do gene *rpoD* comparando a sequência da cepa de *A. dhakensis* obtida no presente trabalho com várias outras cepas dessa espécie e algumas de *A. hydrophila*. No topo é mostrado o alinhamento de nucleotídeos e, na parte de baixo é mostrado o alinhamento de aminoácidos. Note a inserção dos nucleotídeos GACGAA na sequência da cepa sul-americana codificando os aminoácidos Ácido Aspártico e Ácido Glutâmico (letras D e E de acordo com o código de aminoácidos da IUPAC)..... 35
- Figura 2.** Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise das sequências concatenadas dos genes *gyrB* e *rpoD* (1.366 pb de comparação) mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e várias espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Clados compostos por cepas que não sejam de *A. dhakensis* e *A. hydrophila* estão comprimidos. Barra = 0,02 substituições por posição..... 37
- Figura 3.** Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise de sequências parciais do gene 16S rRNA mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e as cepas-tipo de todas as espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Números de acesso do GenBank são dados na frente dos nomes das espécies. Barra = 0,02 substituições por posição..... 38
- Figura 4.** Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise das sequências parciais do gene *gyrB* mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e várias espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Números de acesso do GenBank são dados na frente dos nomes das espécies. Barra = 0,02 substituições por posição..... 39
- Figura 5.** Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise das sequências parciais do gene *rpoD* mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e várias espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Números de acesso do GenBank são dados na frente dos nomes das espécies. Barra = 0,02 substituições por posição..... 40
- Figura 6.** Exemplar de *P. Mesopotamicus* infectado por injeção intraperitoneal com *A. dhakensis*. Note os focos hemorrágicos nos olhos, brânquias, nadadeiras e região anal (setas) e inchaço abdominal (estrela)..... 44
- Figura 7.** Comparação das sequências obtidas a partir das ampliações com os *primers* desenhados para qPCR em relação às sequências iniciais de *Arg1* e *Arg2*, onde pode-se verificar que as ampliações são específicas para cada isoforma..... 66
- Figura 8.** Comparação das sequências do gene α -tropomiosina de pacu, pirapitinga e

tambaqui mostrando a ocorrência de *indels* nas posições 88 e 96..... 68

Figura 9. Comparação dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do gene α -tropomiosina de pacu, tambaqui e do híbrido tambacu onde pode-se observar os locais de substituição de nucleotídeos entre as espécies puras e a presença de dois picos no sequenciamento da espécie híbrida, indicando a ocorrência de heterozigose..... 70

Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg1 de *P. mesopotamicus* em comparação com as espécies de peixes *Cyprinus carpio*, *Danio rerio* e *Esox lucius*, e com a sequência de humanos. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. mesopotamicus*, traços indicam a ocorrência de *gaps*. Sequências específicas da família Arginase são indicados em cinza claro; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn²⁺A (+), Mn²⁺B (Ψ) ou ambos Mn²⁺A e B (\P) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (II) são indicadas. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes..... 72

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg2 de *P. mesopotamicus* em comparação com as espécies de peixes *Cyprinus carpio*, *Danio rerio* e *Esox lucius*, e com a sequência de humanos. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. mesopotamicus*, traços indicam a ocorrência de *gaps*. Sequências específicas da família Arginase são indicados em cinza claro; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn²⁺A (+), Mn²⁺B (Ψ) ou ambos Mn²⁺A e B (\P) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (II) são indicadas. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes..... 73

Figura 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene iNOS de *P. mesopotamicus* em comparação com as espécies de peixes *Cyprinus carpio*, *Danio rerio* e *Oncorhynchus mykiss*, e com a sequência de humanos. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. mesopotamicus*, traços indicam a ocorrência de *gaps*. Um dos sítios conservados de ligação de cofator da enzima está indicado em cinza. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes..... 74

Figura 13. Gráficos de expressão basal dos genes Arg1, Arg2 e iNOS observados por qPCR no fígado, rim e baço de *P. mesopotamicus* em relação à média geométrica dos controles endógenos 18S rRNA e β -actina. Os dados estão apresentados como média + desvio padrão. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 76

Figura 14. Expressão por qPCR dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de *P. mesopotamicus* infectados com *A. dhakensis* (■) e controle não infectados (■) nos períodos de 0 h, 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção em relação à média geométrica dos controles endógenos 18S rRNA e β -actina. Os dados estão apresentados como média + desvio padrão. Asteriscos indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA, gyrB e rpoD da cepa sul-americana de <i>A. dhakensis</i>	27
Tabela 2. Perfil bioquímico de <i>A. dhakensis</i> fornecido pelo sistema de identificação automatizado VITEK 2.....	32
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a antibióticos da cepa isolada de <i>A. dhakensis</i>	33
Tabela 4. Divergências entre as sequências concatenadas dos genes gyrB e rpoD da cepa sul-americana de <i>A. dhakensis</i> em relação a cepas de outras espécies de <i>Aeromonas</i>	41
Tabela 5. Dados de mortalidade observados no experimento de dose letal média (DL ₅₀)..	44
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para amplificação inicial, sequenciamento e análise da expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de <i>P. mesopotamicus</i>	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O GÊNERO <i>Aeromonas</i>	14
1.2 MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PEIXES.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVO GERAL.....	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. CAPÍTULO I - Caracterização de uma nova cepa de <i>Aeromonas dhakensis</i> isolada de um exemplar doente de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	22
4.1 INTRODUÇÃO.....	22
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.2.1 Isolamento da bactéria.....	24
4.2.2 Identificação fenotípica da cepa isolada.....	24
4.2.3 Identificação molecular da cepa isolada.....	25
4.2.4 Estimativa da virulência da cepa isolada de <i>A. dhakensis</i> para <i>P. mesopotamicus</i>	28
4.3 RESULTADOS.....	31
4.3.1 Identificação fenotípica da cepa isolada.....	31
4.3.2 Identificação molecular da cepa isolada.....	34
4.3.3 Estimativa de DL ₅₀ de <i>A. dhakensis</i> para <i>P. mesopotamicus</i>	42
4.4 DISCUSSÃO.....	46
5. CAPÍTULO II – Caracterização e análise de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de <i>P. mesopotamicus</i> em resposta à infecção por <i>A. dhakensis</i>.....	52
5.1 INTRODUÇÃO.....	52
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
5.2.1 Caracterização molecular dos peixes.....	56

5.2.2 Infecção experimental.....	58
5.2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	59
5.2.4 Caracterização dos genes Arg-1, Arg-2 e iNOS de <i>P. mesopotamicus</i>	60
5.2.5 Análise da expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de <i>P. mesopotamicus</i> ..	64
5.2.6 Análise estatística.....	66
5.3 RESULTADOS.....	68
5.3.1 Caracterização molecular dos peixes.....	68
5.3.2 Caracterização dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de <i>P. mesopotamicus</i>	71
5.3.3 Análise de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS em <i>P. mesopotamicus</i> após desafio com a bactéria <i>A. dhakensis</i>	75
5.4 DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXO I.....	99

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o consumo de pescado representa uma importante fonte de alimento em muitos países, principalmente nos chamados “países em desenvolvimento”. No ano de 2010, a produção mundial de pescado foi de 148,5 milhões de toneladas, sendo que desses, 128,3 milhões de toneladas (86,4%) foram destinadas para alimentação humana, o que representou um aumento de aproximadamente 3% em relação ao ano anterior. O consumo per capita foi de cerca de 19 kg, o que representou aproximadamente 17% de toda proteína animal consumida por habitante no mundo (FAO, 2013).

No Brasil essa tendência também é observada, já que, de acordo com dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) do ano de 2011, a produção de pescado foi de 1.431.974,4 t, registrando um aumento de 13% em relação ao ano anterior, sendo que grande parte dessa produção (38,1%) foi obtida através da aquicultura continental (MPA, 2013). Essa modalidade de produção apresentou um aumento de 51,2% em relação ao ano de 2009, passando de 415.649 t em 2009 para uma produção de 479.399 t em 2010 e posteriormente para 628.704,3 t em 2011, confirmando a tendência de crescimento nas taxas de produção de pescados por aquicultura de peixes de água doce (MPA, 2013).

Dentre as espécies nativas com alto potencial para produção, destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) que é a segunda espécie com maior produção na aquicultura continental nacional no ano de 2011, com uma produção de 21.689,3 t. Dentre as espécies nativas, apenas o tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresentou números de produção maiores. O pacu também possui grande importância na produção do híbrido tambacu, obtido a partir do cruzamento entre uma fêmea de *C. macropomum* e um macho de *P. mesopotamicus*, que, embora não seja uma espécie pura nativa, apresentou uma produção de 49.818 t por aquicultura continental em 2011 (MPA, 2013).

Peixes de sistemas de criação geralmente são mantidos em condições não ideais quando comparadas ao ambiente natural, muitas vezes sob condições de confinamento com alta densidade populacional. Devido a isso, a ocorrência de doenças é frequente, sendo que infecções bacterianas constituem uma das principais causas de problemas em sistemas de criação de vários tipos de peixes (WOO, 2006). Economicamente, doenças causadas por bactérias do gênero *Aeromonas* são as de maior importância em peixes de água doce cultivados (AOKI, 1999).

1.1 O GÊNERO *Aeromonas*

Bactérias do gênero *Aeromonas* são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos em forma de bastonete com ampla distribuição geográfica. Não produzem esporos, não são encapsuladas e possuem motilidade devido a um flagelo polar monótrico. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0 e 5°C, a máxima entre 38 e 41°C e a ótima entre 22 e 28°C. Os valores de pH ótimo para crescimento variam de 5,5 a 9,0 (AOKI, 1999; MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2005).

Aeromonas spp. são importantes patógenos para humanos, os quais apresentam uma crescente ameaça para a saúde pública, uma vez que infecções causadas por estes organismos geralmente são adquiridas pelo consumo de água e alimentos contaminados, principalmente em países em desenvolvimento (JANDA; ABBOTT, 2010). Além disso, várias espécies de animais de diversos grupos taxonômicos utilizados na aquicultura, principalmente peixes são susceptíveis à infecção por essas bactérias (JANDA; ABBOTT, 1998). Em peixes, apresentam grande patogenicidade associada a condições de estresse, causando septicemia hemorrágica, que se caracteriza pela presença de pequenas lesões cutâneas superficiais, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, exoftalmia e distensão

abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN; AUSTIN, 2007).

Aeromonas spp. são tipicamente reconhecidas como patógenos oportunistas ou invasores secundários (AUSTIN; AUSTIN, 2007). Porém, alguns fatores predisponentes tais como repentina mudança de temperatura, diminuição da taxa de oxigênio dissolvido, elevada densidade populacional de peixes, meio eutrófico ou danos causados à superfície corporal dos peixes, podem tornar essas bactérias patógenos primários em potencial (AOKI, 1999). Essas condições desfavoráveis são identificadas como estressantes aos peixes e causam prejuízos aos mecanismos de defesa através de um aumento na liberação de cortisol, diminuindo a função dos linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Tais alterações de função tornam os peixes mais susceptíveis a doenças, principalmente as causadas por bactérias (JENEY et al., 1997).

Apesar da importância dessas bactérias como patógenos em peixes e em humanos, os métodos utilizados para o seu controle em pisciculturas ainda são primários e se limitam a tratamento com produtos químicos como o azul de metileno, permanganato de potássio, sulfato de cobre, verde de malaquita e antibióticos a base de cloranfenicol e oxitetraciclina (WOO, 2006).

1.2 MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PEIXES

O sistema imunológico é um conjunto de estruturas e processos biológicos dentro de um organismo que é capaz de detectar uma grande variedade de agentes, desde vírus até parasitas, proteger contra doenças e distinguir tais agentes dos tecidos saudáveis do próprio organismo. O sistema imunológico é constituído por vários níveis de mecanismos de defesa com crescente especificidade para combater infecções (ALBERTS et al., 2008). A primeira linha de defesa do organismo contra infecções são as barreiras físicas, que em peixes são

principalmente os tecidos mucosos, como pele, brânquias e intestinos (PRESS; EVENSEN, 1999). Se um patógeno atravessa essas primeiras barreiras, o sistema imunológico inato fornece uma resposta imediata, porém inespecífica. Isso significa que as células do sistema inato reconhecem e respondem a patógenos de maneira genérica. Se o sistema inato não for capaz de eliminar a infecção, os vertebrados possuem um segundo tipo de proteção chamado de sistema imunológico adaptativo ou adquirido, que se adapta ao longo da infecção para melhorar o reconhecimento e produzir uma resposta mais específica ao patógeno, além de ser capaz de agir a longo prazo por mecanismos de memória imunológica (RAUTA; NAYAK; DAS, 2012).

Peixes possuem tanto imunidade inata, como imunidade adquirida, entretanto, nesses animais, o sistema imunológico inato é mais efetivo e possui maior importância na resposta a patógenos do que o sistema adaptativo (RAUTA et al., 2012).

Os órgãos responsáveis por produzir elementos do sistema imunológico em peixes são semelhantes aos de mamíferos, com exceção dos nódulos linfáticos e medula óssea, que não estão presentes nos peixes. Em peixes, um dos principais órgãos linfoides é o rim, que possui subdivisões com variações anatômicas e funcionais. A porção anterior, também conhecida como rim cranial, possui baixa atividade excretora e é considerado um órgão predominantemente linfo-mielóide com importante função hematopoiética. O rim posterior, ou médio, é um compartimento glomerular que possui tanto funções renais como imunológicas (PRESS; EVENSEN, 1999).

O baço é considerado o segundo órgão mais importante em relação à resposta imunológica, tendo papel fundamental na hematopoese, degradação de antígenos e produção de anticorpos. Como peixes não possuem linfonodos, o baço tem importante papel na retenção de antígenos (PRESS; DANNEVIG; LANDSVERK, 1994).

Outro órgão com reconhecida importância imunológica em peixes é o fígado, responsável pela produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (DASH et al., 2015; GRASSO et al., 2015; LIU, Y. J. et al., 2015; PIETSCH et al., 2015), além de ser o principal órgão em que ocorre o ciclo da ornitina-ureia (OUC) pela enzima arginase. A produção de ureia está diretamente relacionada com o consumo de L-arginina, que é o mesmo substrato utilizado na produção de óxido nítrico (NO) em resposta a infecções pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SRIVASTAVA; RATHA, 2013).

Vários estudos tem tentado determinar fatores intrínsecos do sistema imunológico em peixes que conferem resistência contra bactérias, sendo que muitos deles indicaram que a resistência a elas está relacionada a parâmetros imunológicos inatos não específicos, que provavelmente afetam a capacidade do peixe resistir ao patógeno antes de haver resposta imune específica (MARSDEN et al., 1996; RØED; FEVOLDEN; FJALESTAD, 2002; RØED et al., 1993).

ARDO et al. (2010) demonstraram que diferentes famílias de carpas (*Cyprinus carpio*), com diferentes níveis de resistência a *A. hydrophila*, apresentaram parâmetros imunológicos distintos, tais como, variações de atividade fagocítica e de lisozimas, e que existe uma correlação entre essas variações e a resistência contra *A. hydrophila*. SARDER et al. (2001) observaram que o cruzamento de clones mais resistentes de tilápia (*Oreochromis niloticus* L.) com um clone mais susceptível produzia descendentes mais resistentes do que o clone parental susceptível, sugerindo que existe uma dominância na herança de susceptibilidade em direção ao parental mais resistente.

Fatores relacionados com a inabilidade do sistema imune de alguns peixes em produzirem uma resposta eficiente contra a infecção de bactérias ainda são pouco conhecidos.

Dentro da imunologia já é amplamente conhecida a importância dos macrófagos no sistema imunológico, possuindo diversas funções biológicas como fagocitose, destruição de

microorganismos, apresentação de antígenos, atividades pro- e/ou anti-inflamatórias, entre outras. Nos últimos anos, distintos subgrupos de macrófagos tem sido demonstrados, sendo que os que são melhores caracterizados são os macrófagos ativados através da via clássica (macrófagos M1). Essas células possuem papel essencial na proteção contra patógenos intracelulares através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de óxido nítrico (NO). Em contraste, macrófagos ativados através da via alternativa (macrófagos M2) não são capazes de produzir NO a partir de L-arginina, e assim não limitam eficientemente o crescimento de patógenos intracelulares, além disso tem função imunossupressora para proteger órgãos e tecidos contra os efeitos citotóxicos das EROs e NO em inflamações crônicas (NOËL et al., 2004).

Uma das principais formas de discriminar macrófagos M1 de M2 é através da análise do balanço entre iNOS e arginase por métodos bioquímicos ou, mais recentemente, principalmente por métodos moleculares (NOËL et al., 2004). Dessa forma, o presente trabalho objetivou analisar o balanço entre macrófagos M1 e M2 em diferentes órgãos de *P. mesopotamicus* em resposta à infecção por uma cepa sul-americana de *A. dhakensis*.

2. JUSTIFICATIVA

Os chamados peixes “redondos”, os quais incluem a espécie *P. mesopotamicus*, são de grande importância no contexto da pesca extrativista continental e, mais recentemente, têm sido introduzidos com grande sucesso na piscicultura. A inserção desta espécie na piscicultura vem demandando grandes esforços na adequação do manejo reprodutivo, nutricional e sanitário, sempre visando melhorar a produtividade.

Tanto em ambiente natural quanto em cultivo, peixes são alvos de infecção de um grande número de patógenos, como parasitas, vírus e bactérias, que podem ser responsáveis por infecção primária ou serem oportunistas infectando peixes já portadores de alguma enfermidade.

Entre as bactérias, as de maior importância na piscicultura são as do gênero *Aeromonas*, responsáveis por grandes prejuízos para piscicultores, uma vez que podem ser altamente patogênicas em peixes submetidos a condições de estresse, que são comuns devido ao manejo necessário para o cultivo, além de apresentarem patogenicidade a humanos, o que aumenta ainda mais a necessidade de desenvolvimento de medidas que visem a diminuição da ocorrência dessas bactérias em pisciculturas.

Atualmente, não está disponível nenhum quimioterápico ou vacina comercial que sejam efetivos no controle ou prevenção da infecção por bactérias do gênero *Aeromonas* a longo prazo em peixes. Os tratamentos utilizados para combater esta enfermidade baseiam-se no uso de produtos químicos como o azul de metileno, permanganato de potássio, sulfato de cobre, verde de malaquita e antibióticos a base de cloranfenicol e oxitetraciclina. Esses produtos são de alto custo, elevada toxicidade e podem deixar resíduos na carne colocando em risco o consumidor e causar impacto negativo ao meio ambiente.

Até o momento, pouco se sabe a respeito dos mecanismos imunológicos relacionados à resistência à infecção por *Aeromonas* spp. em peixes sul-americanos. Por isso, identificar e entender os mecanismos envolvidos nas respostas imunológicas envolvidas na resposta dos peixes a patógenos do gênero *Aeromonas* é de grande importância, o que pode oferecer uma maior opção de manejo para piscicultores na tentativa de diminuir os danos causados por essa bactéria em ambientes de criação.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes das enzimas arginase 1, arginase 2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em pacu (*P. mesopotamicus*) infectado experimentalmente por uma cepa sul-americana da bactéria *A. dhakensis* através de análises por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qPCR).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a cepa de *Aeromonas* isolada de um peixe da espécie *P. mesopotamicus* com suspeita da infecção pela bactéria através de métodos bioquímicos e de susceptibilidade a antibióticos.
- Caracterizar a cepa isolada por métodos moleculares (amplificação, sequenciamento e filogenia dos genes 16S rRNA, gyrB e rpoD) e comparar com a identificação obtida a partir da caracterização fenotípica.
- Infectar experimentalmente exemplares de *P. mesopotamicus* com a bactéria isolada para determinação da virulência para esse peixe através do cálculo da dose letal média (DL₅₀)
- Caracterizar por métodos moleculares (amplificação e sequenciamento do gene α -tropomiosina) exemplares de *P. mesopotamicus* que foram adquiridos para a realização das infecções experimentais com a bactéria isolada.
- Isolar e caracterizar o cDNA dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de *P. mesopotamicus* e avaliar os níveis de expressão desses genes no fígado, rim anterior e baço dos peixes experimentalmente infectados pela cepa de *Aeromonas* isolada, durante vários períodos pós-infecção.

4. CAPÍTULO I - Caracterização de uma nova cepa de *Aeromonas dhakensis* isolada de um exemplar doente de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

4.1 INTRODUÇÃO

Membros do gênero *Aeromonas* são bactérias Gram-negativas móveis em forma de bastonete. Possuem distribuição global e são frequentemente encontradas em muitos ambientes de água doce como rios, lagos e lagoas, além de esgoto doméstico e água potável processada (HOLMES; NICCOLLS; SARTORY, 1996).

Quando as primeiras espécies do gênero foram descritas, acreditava-se que *Aeromonas* spp. causavam enfermidades sistêmicas apenas em animais ectotérmicos. Porém, ao longo dos anos, pesquisadores demonstraram que um grande número de espécies de *Aeromonas* são patógenos humanos oportunistas, especialmente em associação com doenças gastrointestinais, como “diarreia do viajante” e gastroenterite pediátrica (FIGUERAS; BEAZ-HIDALGO, 2015; JANDA; ABBOTT, 2010; JOSEPH, 1996). Hoje em dia, membros do gênero *Aeromonas* estão entre os principais patógenos causadores de doenças não apenas em peixes, mas também são considerados agentes etiológicos de uma variedade de complicações infecciosas tanto em humanos imunocompetentes como imunocomprometidos (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013; FIGUERAS; BEAZ-HIDALGO, 2015; JANDA; ABBOTT, 2010).

Um grupo de isolados bacterianos recuperados de fezes de uma criança com diarreia em Bangladesh mostraram características distintas das típicas cepas de *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*, que é a espécie-tipo do gênero, e foram utilizadas para propor a classificação da subespécie *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* (HUYS et al., 2002). Posteriormente, baseando-se na análise filogenética dos genes 16S rRNA, rpoD e gyrB, e das

sequências concatenadas dos genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* e *gyrA*, BEAZ-HIDALGO; MARTINEZ-MURCIA; FIGUERAS (2013) propuseram a reclassificação de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*. Esses autores sugeriram que essa espécie, e a espécie *Aeromonas aquariorum*, originalmente descrita por MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al. (2008) a partir da água de aquários de peixes ornamentais em Porto, Portugal, são o mesmo táxon e, dessa forma, propuseram a sinonimização das duas espécies como *Aeromonas dhakensis*.

Essa espécie (seja classificada como *A. dhakensis*, como uma subespécie de *A. hydrophila* ou como *A. aquariorum*) tem sido descrita habitualmente sendo isolada de fezes e isolados clínicos de humanos, peixes doentes ou água doce ambiental na Europa (ESTEVE; ALCAIDE; BLASCO, 2012; ESTEVE; ALCAIDE; GIMENEZ, 2015; LOBOVA et al., 2015), Ásia (HUYS et al., 2002; PUAH et al., 2013; WU et al., 2015), África (GHENGHESH et al., 2014), México (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2013) e Austrália (ARAVENA-ROMAN et al., 2014). Recentemente, *A. dhakensis* foi associada à ocorrência de pneumonia hemorrágica necrotizante e sepse em golfinhos Risso (*Grampus griseus*) neonato no Mar Mediterrâneo na Espanha, aumentando o número de hospedeiros potenciais para essa espécie de bactéria (PEREZ et al., 2015).

Até o presente momento, não existem relatos na literatura pesquisada a respeito da ocorrência de *A. dhakensis* infectando *P. mesopotamicus* ou qualquer outra espécie de peixe na América do Sul. Portanto, o presente estudo fornece a primeira caracterização de uma cepa de *A. dhakensis* isolada de um peixe infectado obtido de uma piscicultura no Brasil, através de análises filogenéticas moleculares, perfil bioquímico, susceptibilidade a antimicrobianos e virulência para *P. mesopotamicus*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária – ZMV da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, campus de Pirassununga – SP e o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMbio) em Pirassununga, estado de São Paulo.

4.2.1 Isolamento da bactéria

Um alevino de *P. mesopotamicus* com suspeita de infecção por *Aeromonas*, obtido da piscicultura do CEPTA/ICMBio, no município de Pirassununga, estado de São Paulo, apresentando escurecimento da pele, natação errática e vários graus de úlceras hemorrágicas no corpo foi eutanasiado por overdose de benzocaína. O peixe foi necropsiado e fragmentos de fígado, baço, rim, músculo e pele foram assepticamente coletados e homogeneizados por 2-3 min em 1,0 mL de caldo tríptico de soja (TSB; BD Difco™, EUA). Após um período de incubação de 24h a 30°C, 50 µL da cultura foram inoculados em placas de ágar tríptico de soja (TSA; BD Difco™, EUA) e incubados por 24h a 30°C.

Cinco das colônias obtidas foram selecionadas aleatoriamente, inoculadas em 1 mL de TSB e incubadas por 24h a 30°C. Para armazenamento a longo prazo, glicerol (30% v/v) foi adicionado a essas culturas, que foram mantidas a -80°C.

4.2.2 Identificação fenotípica da cepa isolada

As colônias isoladas foram submetidas a identificação bioquímica e análise de susceptibilidade a antimicrobianos utilizando-se o sistema automático de identificação bacteriana VITEK 2 (bioMérieux, França) equipado com o *software* versão 5.04. As culturas de colônias puras foram centrifugadas a $2.000 \times g$ por 5 min, o meio de cultura sobrenadante foi removido e as bactérias foram ressuspensas em 3,0 mL de solução salina de NaCl 0,9% estéril. A turbidez foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland e então cada uma das suspensões foi inoculada no cartão *VITEK 2 GN reaction card*, que realiza um conjunto de 47 testes bioquímicos para a identificação de bactérias Gram-negativas. O cartão *VITEK AST-N239 susceptibility test card* foi utilizado para determinar os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefuroxima, cefuroxima/axetil, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, iminipenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, tigeciclina e colistina. A Concentração Mínima Inibitória (MIC) para cada antimicrobiano também foi avaliada pelo sistema VITEK 2.

4.2.3 Identificação molecular da cepa isolada

A identificação molecular foi realizada com base em amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e análise filogenética de sequências parciais dos genes 16S rRNA, DNA girase (topoisomerase tipo II) subunidade B (*gyrB*) e RNA polimerase fator sigma 70 (sigma D) (*rpoD*).

O DNA genômico foi isolado através do método de extração térmica. Para isso, 1,0 mL da cultura foi centrifugada a $2.000 \times g$ por 5 minutos e o meio de cultura sobrenadante foi removido. O pellet foi então lavado e ressuspensado em água ultrapura (Mili-Q), transferido

para um banho seco a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferido para o gelo por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e, ao final, a suspensão foi centrifugada 10.000 × g por 10 minutos. 150 µL do sobrenadante contendo o DNA bacteriano liberado foi coletado. O DNA genômico total foi espectrofotometricamente quantificado utilizando-se o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e armazenado a -20°C.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador AG 22331 Hamburg Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) e constituíram de 10-50 ng de DNA genômico, 2,5 µL de 10X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, EUA), 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,5 µL de cada *primer* (0,2 µM), 0,25 µL de DreamTaq DNA Polymerase (ThermoScientific, EUA) e água ultrapura para um volume final de 25 µL. O programa da PCR consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* (52°C por 60 segundos para 16S rRNA e a 55°C por 30 segundos para *gyrB* e *rpoD*) e extensão a 72°C (120 segundos para 16S rRNA e 60 segundos para *gyrB* e *rpoD*), precedidos por um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e sucedidos por uma extensão terminal a 72°C por 3 minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o tamanho das bandas foi comparado com o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Os *amplicons* foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e sequenciados utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA). Os detalhes e sequências dos *primers* utilizados tanto para as reações de PCR quanto para os sequenciamentos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA, gyrB e rpoD de *A. dhakensis*.

Gene	Primers	Sequência 5'-3'	Posição*	Referência
16S	16S0F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	8-27	(MARTINEZ-MURCIA et al., 1999)
	16S5R**	TTACCGCGGCTGCTGGCACG	533-514	(MARTINEZ-MURCIA et al., 1999)
	16S9R**	CCGTCAATTCATTTGAGTTT	926-908	(MARTINEZ-MURCIA et al., 1999)
	16S15R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1492-1510	(MARTINEZ-MURCIA et al., 1999)
gyrB	gyrB3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	334-353	(YANEZ et al., 2003)
	gyrB7F**	GGGGTCTACTGCTTCACCAA	792-812	(YANEZ et al., 2003)
	gyrB9Rs**	CCTTGACCGAAATGACCGCC	980-960	(YANEZ et al., 2003)
	gyrB14R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	1460-1441	(YANEZ et al., 2003)
rpoD	rpoD70Fs	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	280-302	(YAMAMOTO et al., 2000)
	rpoD8F**	CGTCAATTCCGCTGATGCC	769-788	(MARTINEZ-MURCIA et al., 2011)
	rpoD11R	ATGCTCATGCGRCGGTTGAT	1100-1081	(MARTINEZ-MURCIA et al., 2011)

*De acordo com a numeração das sequências de *E. coli*.

***Primers* utilizados apenas para sequenciamento.

As sequências foram visualizadas, montadas e editadas com o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). Para cada sequência, uma busca através da ferramenta nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) foi realizada no website do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar que os genes foram corretamente amplificados e sequenciados.

Árvores filogenéticas baseadas nos genes 16S rRNA, gyrB e rpoD foram construídas a partir da comparação das sequências da cepa isolada nesse trabalho com todas as cepas-tipo do gênero *Aeromonas* e várias cepas de *A. dhakensis* (incluindo as que foram descritas como *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* e *A. aquariorum*), obtidas do GenBank. Os alinhamentos das sequências foram realizados pelo ClustalW implementado no programa BioEdit 7.1.3.0. Análises filogenéticas foram conduzidas independentemente para cada gene com o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) empregando o método de inferência filogenética Neighbor-Joining. O modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2P) foi utilizado na análise. Uma análise de bootstrap com 1.000 réplicas foi empregado para avaliar a confiabilidade dos ramos

das árvores resultantes. Todas as posições que continham *gaps* ou dados faltantes foram eliminadas das análises. Foi realizada uma análise filogenética concatenada com os genes *gyrB* e *rpoD* tratados como uma única sequência de nucleotídeos (1.366 pb) utilizando-se a mesma metodologia descrita acima.

As porcentagens de substituição de nucleotídeos entre as sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* da cepa sul-americana de *A. dhakensis* em relação às outras cepas utilizadas nas análises foi avaliada através da construção de uma Matriz de Divergência Par-a-Par com o programa MEGA 6 utilizando-se o modelo p-distância. Todas as posições que continham *gaps* ou dados faltantes foram eliminadas das análises e o conjunto de dados final foi composto por 1.366 posições.

4.2.4 Estimativa da virulência da cepa isolada de *A. dhakensis* para *P. mesopotamicus*

A virulência da cepa de *A. dhakensis* isolada para *P. mesopotamicus* foi determinada através da estimativa da dose letal média (DL₅₀), que foi calculada de acordo com os métodos descritos por REED; MUENCH (1938).

Para isso, juvenis de *P. mesopotamicus* (55,2 ± 1,2 g) provenientes de uma única desova, obtidos de uma piscicultura comercial do estado de São Paulo, foram divididos em grupos de 10 animais e mantidos em 5 aquários de vidro com volume de 60 L com aeração constante por 2 semanas para aclimação antes do desafio com as bactérias. 5 exemplares de pacus obtidos da mesma piscicultura foram aleatoriamente selecionados, eutanasiados e examinados para a presença de parasitas ou outras enfermidades. Fragmentos de rim, fígado e baço foram coletados e cultivados em TSB por 24h a 30°C. Essas culturas foram então

inoculadas em placas de TSA para confirmar que o estoque de peixes era negativo para infecções bacterianas.

Após a aclimatação, os peixes de cada tanque foram injetados por via intraperitoneal com doses que variaram de $3,4 \times 10^3$ a $3,4 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC) de *A. dhakensis* diluídas em 0,1 mL de solução salina de NaCl 0,9% estéril. A determinação das UFCs utilizadas nos desafios foi realizada pelo método *Spread Plate*. Para isso, uma cultura de *A. dhakensis* em meio TSB contendo 10 mg/mL de ampicilina foi expandida até alcançar a densidade ótica (DO) de 0,8 medida a 600 nm no espectrofotômetro Hitachi 2810U. Foram preparadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} em TSB e 0,1 mL de cada uma delas foi semeada em triplicata em placas de TSA. Após um período de incubação de 24h a 30°C, as colônias obtidas em cada diluição foram contadas e o valor em UFC/mL da suspensão original foi calculado. Apenas placas que produziram entre 30 e 300 colônias foram consideradas para o cálculo, as demais foram desconsideradas.

Peixes controle foram injetados com 0,1 mL de solução salina estéril.

Os peixes foram verificados diariamente para a ocorrência de mortalidades por 14 dias pós-infecção. Fragmentos de fígado e rim dos peixes mortos foram coletados assepticamente, cultivados em TSB por 24h a 30°C, e essa cultura foi semeada em placas de TSA e incubadas nas mesmas condições descritas acima. O re-isolamento de *A. dhakensis* foi confirmado através da obtenção do mesmo perfil bioquímico da cepa inicialmente isolada no sistema de identificação bacteriana VITEK 2.

A partir das observações após as infecções, foram calculados os valores acumulados de mortalidade (A), que são valores obtidos a partir da premissa que os peixes que morreram com a infecção de inóculos menos concentrados também morreriam se fossem infectados com os mais concentrados. Para isso, para cada diluição, o número de mortos obtido foi somado ao número de mortos observados na diluições seguintes.

Um cálculo semelhante foi realizado para a obtenção dos valores acumulados de sobrevivência (B). Nesse caso, a premissa foi que peixes que sobreviveram à infecção por uma determinada dose de bactérias, também sobreviveria a uma dose menor.

Em seguida, para se obter a porcentagem de mortalidade para cada diluição, os valores de A foram divididos pela soma de A e B, segundo a equação:

$$\frac{A}{(A + B)} = \% \text{ mortalidade}$$

Posteriormente, o valor da *distância proporcional* entre as duas diluições que obtiveram porcentagem de óbitos logo acima e logo abaixo de 50% foi calculada. Esse cálculo foi realizado seguindo-se a seguinte fórmula:

$$\frac{(\% \text{ mortalidade acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ mortalidade acima de } 50\%) - (\% \text{ mortalidade abaixo de } 50\%)} = \text{distância proporcional}$$

Como as diluições foram realizadas em fator de 10, o resultado obtido na *distância proporcional* foi multiplicado por 1, uma vez que esse é o valor do log 10, e o valor obtido foi adicionado ao logaritmo da diluição com % de mortalidade acima de 50% para se obter o log DL₅₀:

$$(\text{distância proporcional} \times 1) + (\log \text{ diluição acima de } 50\%) = \log DL_{50}$$

Finalmente, a dose letal para 50% dos peixes infectados por *A. dhakensis* foi o nº de UFC obtido na cultura com DO 0,8 a 600 nm, usando como fator de diluição o log DL₅₀ obtido na equação acima.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificação fenotípica da cepa isolada

As culturas obtidas dos órgãos do exemplar doente de *P. mesopotamicus* produziram apenas colônias Gram-negativas, de coloração esbranquiçada e com superfície lisa. Todas as 5 colônias selecionadas para identificação produziram padrão bioquímico no sistema de identificação automatizado VITEK 2, e foram identificadas pelo sistema como sendo *A. hydrophila* com um grau de confiança de 98%. Os detalhes dos resultados obtidos nos testes bioquímicos podem ser observados na Tabela 2.

O teste de susceptibilidade a antibióticos mostrou que a cepa de *Aeromonas* isolada era resistente a ampicilina (MIC \geq 32 μ g/mL), ampicilina/sulbactam (MIC \geq 32 μ g/mL), cefoxitina (MIC \geq 64 μ g/mL) e meropenem (MIC \geq 16 μ g/mL), e sensível a todos os outros antibióticos testados (Tabela 3).

Tabela 2. Perfil bioquímico de *A. dhakensis* fornecido pelo sistema de identificação automatizado VITEK 2.

Teste bioquímico	Código bioquímico	Resultado
Ala-Phe-Pro-Arylamidase	APPA	-
Adonitol	ADO	-
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	PyrA	-
L-Arabitol	IARL	-
D-Cellobiose	dCEL	-
Beta-Galactosidase	BGAL	+
H ₂ S Production	H2S	+
Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase	BNAG	+
Glutamyl Arylamidase pNA	AGLTP	-
D-Glucose	dGLU	+
Gamma-Glutamyl-Transferase	GGT	-
Fermentation/Glucose	OFF	+
Beta-Glucosidase	BGLU	+
D-Maltose	dMAL	+
D-Manitol	dMAN	+
D-Mannose	dMNE	+
Beta-Xylosidase	BXYL	-
Beta-Alanine Arylamidase pNA	BAlap	-
L-Proline Arylamidase	ProA	-
Lipase	LIP	+
Palatinose	PLE	+
Tyrosine Arylamidase	TyrA	-
Urease	URE	-
D-Sorbitol	dSOR	-
Saccharose/Sucrose	SAC	+
D-Tagatose	dTAG	-
D-Trehalose	dTRE	+
Citrate-sodium	CIT	-
Malonate	MNT	-
5-Keto-D-Gluconate	5KG	-
L-Lachate Alkalinization	ILATk	+
Beta-N-Acetyl-Galactosaminidase	NAGA	-
Succinate Alkalinization	SUCT	+
Alpha-Glucosidase	AGLU	-
Alpha-Galactosidase	AGAL	-
Phosphatase	PHOS	-
Glycine Arylamidase	GlyA	-
Ornithine Decarboxylase	ODC	-
Lysine Decarboxylase	LDC	-

L-Histidine Assimilation	IHISa	-
Coumarate	CMT	-
Beta-Glucuronidase	BGUR	-
2,4-Diamino-6,7-Diisopropylpteridine Resistance	O129R	-
Glu-Gly-Arg-Arylamidase	GGAA	+
L-Malate Assimilation	IMLTa	-
Ellman	ELLM	+
L-Lactate Assimilation	ILATa	-

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a antibióticos da cepa isolada de *A. dhakensis*.

Antibiótico	Concentração Mínima Inibitória (MIC) (µg/mL)	Interpretação
Ampicilina	≥ 32	R
Ampicilina/Sulbactam	≥ 32	R
Cefuroxima	≤ 1	S
Cefuroxima/Axetil	≤ 1	S
Cefoxitina	≥ 64	R
Ceftazidima	≤ 1	S
Ceftriaxona	≤ 1	S
Cefepima	≤ 1	S
Imipenem	0.5	S
Meropenem	≥ 16	R
Amicacina	≤ 2	S
Gentamicina	≤ 1	S
Ciprofloxacina	≤ 0,25	S
Tigeciclina	≤ 0,5	S
Colistina	2	S

R = resistente, S = sensível

4.3.2 Identificação molecular da cepa isolada

As análises por sequenciamento dos genes 16S rRNA, *gyrB* e *rpoD* produziram sequências de 1.398, 1.033 e 750 nucleotídeos respectivamente. As buscas BLAST dos genes mostraram um alto grau de similaridade com as sequências de cepas de *A. dhakensis* (incluindo as referidas como *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* e *A. aquariorum*), chegando a 99% para os genes *gyrB* e *rpoD*, e até 100% de similaridade para o gene 16S rRNA com algumas cepas de *A. hydrophila*. As sequências obtidas da cepa isolada de *A. dhakensis* foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KU248777 para 16S, KU248778 para *gyrB* e KU248779 para *rpoD*.

Quando a sequência do gene *rpoD* obtida da cepa brasileira de *A. dhakensis* foi alinhada e comparada com as sequências de outras cepas dessa espécie, um alto grau de similaridade foi observado. Porém, a cepa isolada no presente estudo apresentou diferenças significativas em relação a todas as outras disponíveis na literatura, com a ocorrência de uma inserção de 6 nucleotídeos (GACGAA) em uma região de pequenas repetições em tandem (STR), onde os aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico são codificados de forma alternada, com o primeiro ocorrendo 7 vezes, e o segundo, 6 vezes na posição 556 da sequência de nucleotídeos (de acordo com a numeração da sequência de *E. coli*) (Figura 1). Essa inserção não foi observada em nenhuma outra cepa de *A. dhakensis* isolada em nenhum outro lugar do mundo, sendo uma característica exclusiva da cepa brasileira.

<i>Aeromonas dhakensis</i> (South America)	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC47	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC 2406	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19563	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> 16627	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC442	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC310	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> CECT 7289	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> A2013	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC317	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19565	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19561	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19566	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19567	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19559	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19560	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC318	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19558	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC259	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19564	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> 19686	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC 573	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas aquariorum</i> 3K1C27	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> D100	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> 140p	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> CECT 839	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 2475	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> 63C	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> 830	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 231	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 48	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 27	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 24	ACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGAAGATCTGGCTGACGAGGATGAAGATGAAGACGAAGACGAAGACGAAGA

<i>Aeromonas dhakensis</i> (South America)	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC47	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC 2406	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19563	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> 16627	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC442	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC310	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> CECT 7289	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> A2013	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC317	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19565	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19561	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19566	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19567	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19559	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19560	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC318	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19558	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC259	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19564	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> 19686	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC 573	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas aquariorum</i> 3K1C27	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> D100	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> 140p	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> CECT 839	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 2475	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> 63C	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> 830	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 231	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 48	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 27	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 24	LLLEQYDKYEAQQLRLSDIISGFFIDPNETDDVAPTATHIGSELSSEEDLADEDEDEDEDE--DGDGDDSDDDGDDGGPDPEVAREKFGELRAQYEVTRLSIQQNGR

Figura 1. Alinhamento de seqüências do gene *rpoD* comparando a seqüência da cepa de *A. dhakensis* obtida no presente trabalho com várias outras cepas dessa espécie e algumas de *A. hydrophila*. No topo é mostrado o alinhamento de nucleotídeos e, na parte de baixo é mostrado o alinhamento de aminoácidos. Note a inserção dos nucleotídeos GACGAA na seqüência da cepa sul-americana codificando os aminoácidos Ácido Aspártico e Ácido Glutâmico (letras D e E de acordo com o código de aminoácidos da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)).

As filogenias obtidas a partir tanto das análises individuais de cada gene, como a análise das sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* concatenados, produziram resultados semelhantes (Figuras 2 a 5). A cepa sul-americana de *A. dhakensis* se posicionou em um clado composto exclusivamente por cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* e *A. aquariorum*. Este clado composto por cepas de *A. dhakensis* se apresentou sempre proximamente relacionado com o clado composto por cepas de *A. hydrophila* nas filogenias dos 3 genes, principalmente nas árvores obtidas na análise concatenada e a partir do gene *rpoD*, onde se apresentaram como clados irmãos (Figuras 2 e 5).

A análise da divergência dos genes concatenados mostrou que a porcentagem de variação entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* e as outras cepas dessa espécie variou entre 1,0 e 1,8%, enquanto as diferenças em relação às cepas de *A. hydrophila*, a espécie que se mostrou mais semelhante, variou entre 4,7 a 5,6% para esses genes. Em relação às outras espécies de *Aeromonas* a porcentagem de variação entre esses genes chegou a 14,8% de divergência em relação a cepas de *Aeromonas simiae* (Tabela 4).

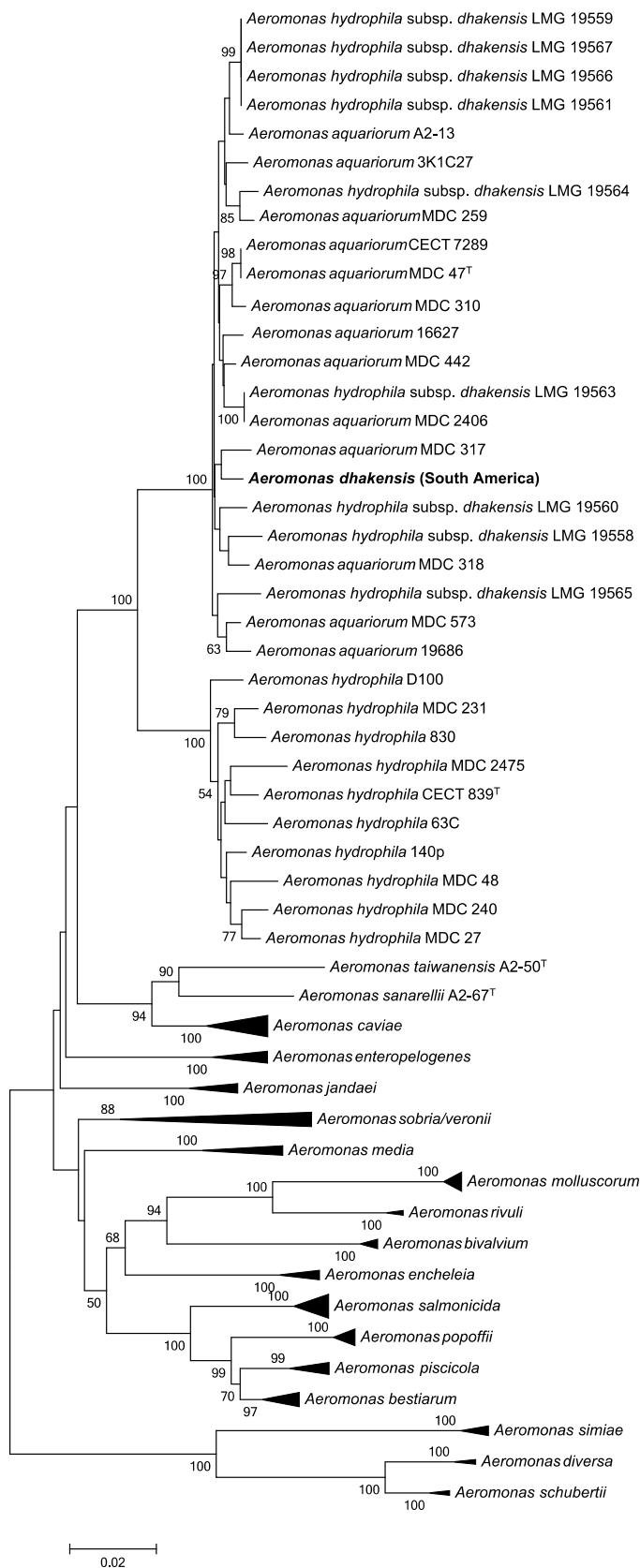


Figura 2. Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise das sequências concatenadas dos genes *gyrB* e *rpoD* (1.366 pb de comparação) mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e várias espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Clados compostos por cepas que não sejam de *A. dhakensis* e *A. hydrophila* estão comprimidos. Barra = 0,02 substituições por posição.

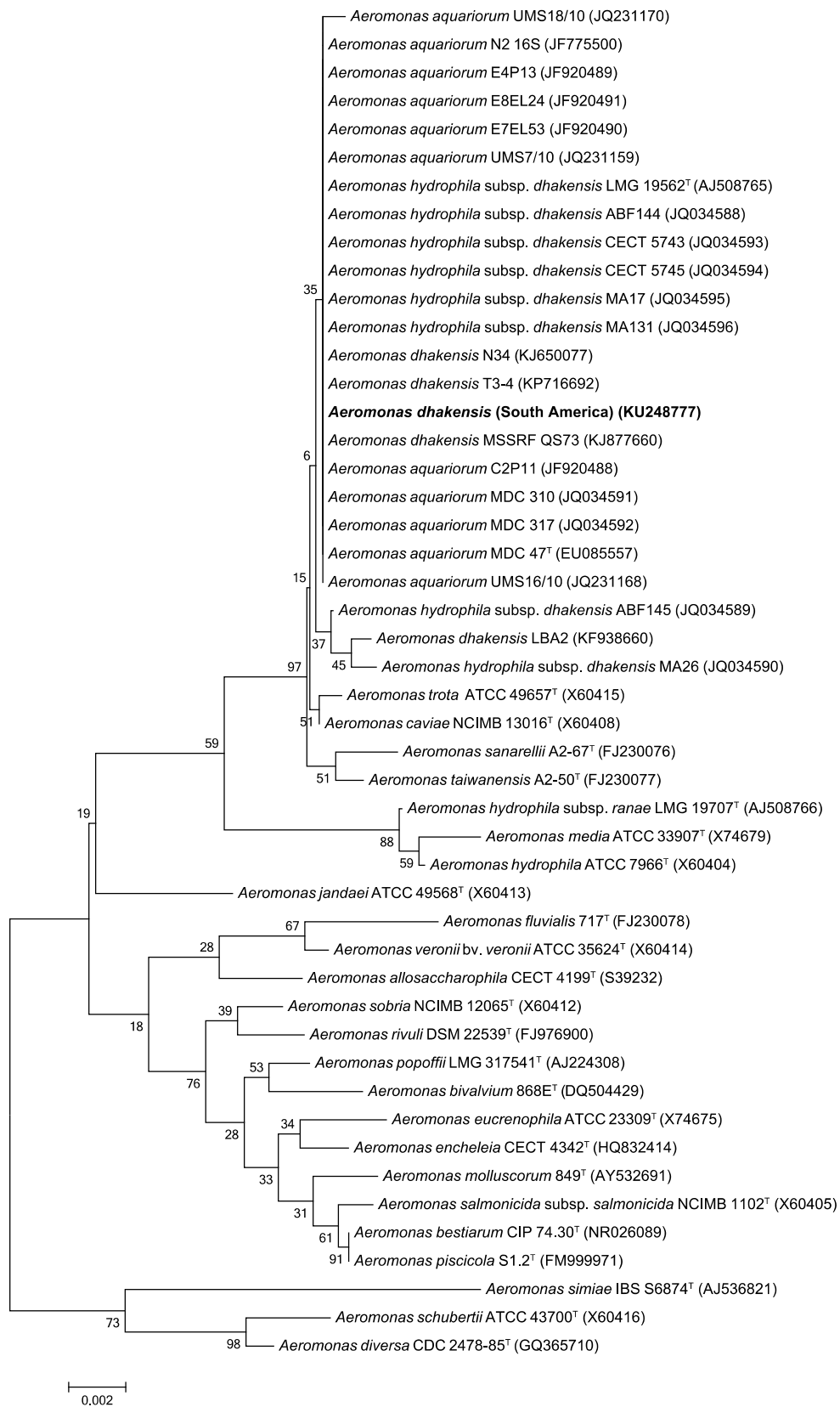


Figura 3. Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise de sequências parciais do gene 16S rRNA mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e as cepas-tipo de todas as espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos. Números de acesso do GenBank são dados na frente dos nomes das espécies. Barra = 0,02 substituições por posição.

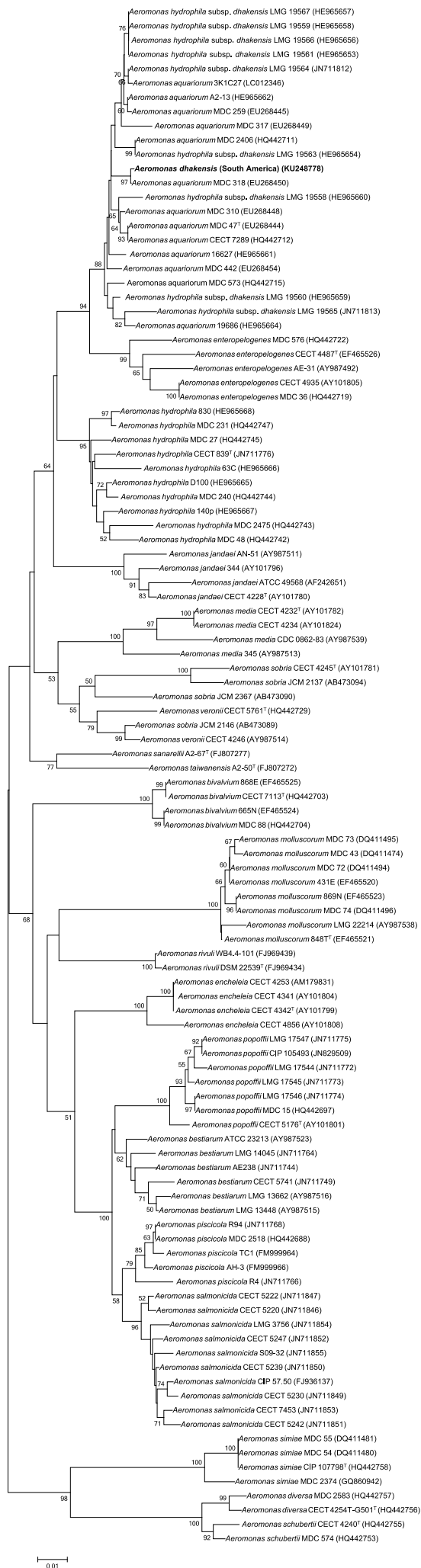


Figura 4. Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise das sequências parciais do gene *gyrB* mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e várias espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Números de acesso do GenBank são dados na frente dos nomes das espécies. Barra = 0,02 substituições por posição.

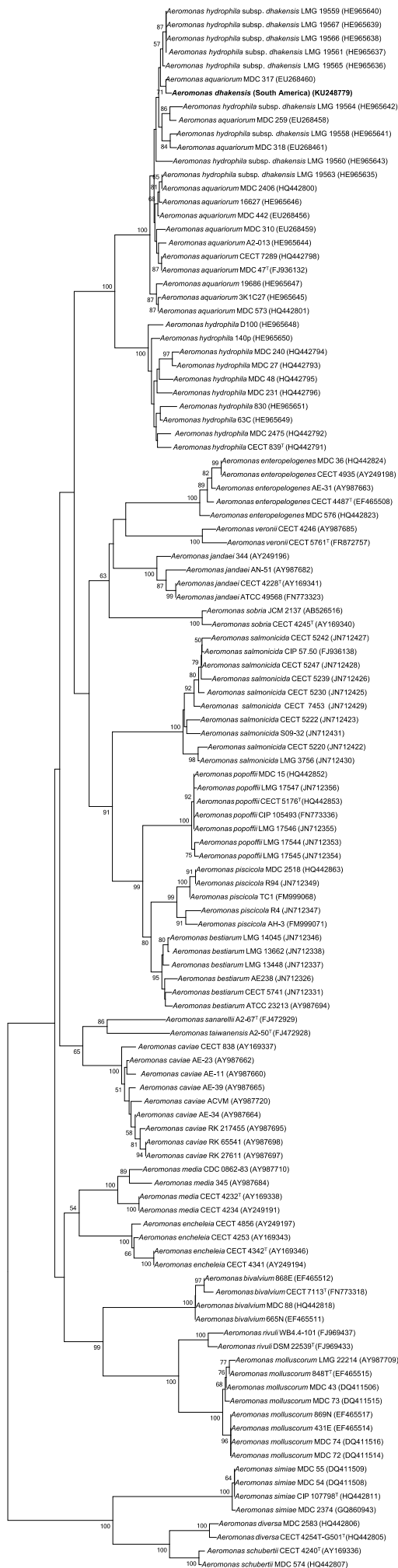


Figura 5. Árvore filogenética de Neighbor-Joining não-enraizada obtida a partir da análise das sequências parciais do gene *rpoD* mostrando o relacionamento entre a cepa sul-americana de *A. dhakensis* (em negrito) e várias espécies do gênero *Aeromonas*. Valores de suporte de *bootstrap* são indicados nos nós dos ramos (valores menores que 50 não mostrados). Números de acesso do GenBank são dados na frente dos nomes das espécies. Barra = 0,02 substituições por posição.

Tabela 4. Divergências entre as sequências concatenadas dos genes *gyrB* e *rpoD* da cepa sul-americana de *A. dhakensis* em relação a cepas de outras espécies de *Aeromonas*.

Cepas	Divergência (%)	Cepas	Divergência (%)
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC47	1,2	<i>Aeromonas piscicola</i> R4	10,6
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC 2406	1,4	<i>Aeromonas piscicola</i> MDC 2518	10,3
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19563	1,4	<i>Aeromonas caviae</i> ACVM	12,4
<i>Aeromonas aquariorum</i> 16627	1,4	<i>Aeromonas caviae</i> RK 65541	7,5
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC442	1,1	<i>Aeromonas caviae</i> RK 27611	7,9
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC310	1,5	<i>Aeromonas caviae</i> AE-39	7,5
<i>Aeromonas aquariorum</i> CECT 7289T	1,2	<i>Aeromonas caviae</i> AE-34	7,2
<i>Aeromonas aquariorum</i> A2-13	1,5	<i>Aeromonas caviae</i> RK 217455	7,5
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC317	1,2	<i>Aeromonas caviae</i> AE-23	7,2
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19565	1,8	<i>Aeromonas caviae</i> AE-11	7,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19561	1,3	<i>Aeromonas caviae</i> CECT 838	7,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19566	1,3	<i>Aeromonas media</i> CDC 0862-83	9,7
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19567	1,3	<i>Aeromonas media</i> 345	9,3
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19559	1,3	<i>Aeromonas media</i> CECT 4232T	9,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19560	1,5	<i>Aeromonas media</i> CECT 4234	9,5
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC318	1,0	<i>Aeromonas encheleia</i> CECT 4342	10,7
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19558	1,8	<i>Aeromonas encheleia</i> CECT 4253	10,2
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC259	1,5	<i>Aeromonas encheleia</i> CECT 4856	10,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19564	1,5	<i>Aeromonas encheleia</i> CECT 4341	10,7
<i>Aeromonas aquariorum</i> 19686	1,6	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> AE-31	7,8
<i>Aeromonas aquariorum</i> MDC 573	1,5	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> CECT 4487	7,8
<i>Aeromonas aquariorum</i> 3K1C27	1,5	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> CECT 4935	7,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> D100	4,7	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> MDC 36	7,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> 140p	4,8	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> MDC 576	7,3
<i>Aeromonas hydrophila</i> CECT 839	5,0	<i>Aeromonas jandaei</i> AN-51	8,4
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 2475	5,6	<i>Aeromonas jandaei</i> ATCC 49568	8,6
<i>Aeromonas hydrophila</i> 63C	5,3	<i>Aeromonas jandaei</i> CECT 4228	8,0
<i>Aeromonas hydrophila</i> 830	5,4	<i>Aeromonas jandaei</i> 344	7,8
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 231	5,1	<i>Aeromonas sobria</i> CECT 4245	10,7
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 48	5,6	<i>Aeromonas sobria</i> JCM 2137	10,7
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 27	5,2	<i>Aeromonas sobria</i> JCM 2367	9,3
<i>Aeromonas hydrophila</i> MDC 240	5,4	<i>Aeromonas sobria</i> JCM 2146	9,2
<i>Aeromonas salmonicida</i> CIP 57.50	10,7	<i>Aeromonas veronii</i> CECT 5761T	10,0
<i>Aeromonas salmonicida</i> S09-32	10,5	<i>Aeromonas veronii</i> CECT 4246	9,7
<i>Aeromonas salmonicida</i> LMG 3756	10,5	<i>Aeromonas bivalvium</i> 868E	10,8
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 7453	10,7	<i>Aeromonas bivalvium</i> 665N	10,5
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 5247	10,5	<i>Aeromonas bivalvium</i> CECT 7113	11,1
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 5242	11,1	<i>Aeromonas bivalvium</i> MDC 88	10,5
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 5239	10,8	<i>Aeromonas rivuli</i> WB4.4-101	11,3
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 5230	10,9	<i>Aeromonas rivuli</i> DSM 22539	11,4
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 5222	10,2	<i>Aeromonas molluscorum</i> LMG 22214	13,1
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 5220	10,2	<i>Aeromonas molluscorum</i> 848	12,5
<i>Aeromonas popoffii</i> LMG 17547	10,8	<i>Aeromonas molluscorum</i> 869N	12,9
<i>Aeromonas popoffii</i> LMG 17546	10,8	<i>Aeromonas molluscorum</i> 431E	12,7
<i>Aeromonas popoffii</i> LMG 17545	10,9	<i>Aeromonas molluscorum</i> MDC74	12,9
<i>Aeromonas popoffii</i> LMG 17544	10,8	<i>Aeromonas molluscorum</i> MDC73	12,8
<i>Aeromonas popoffii</i> CIP 105493	10,8	<i>Aeromonas molluscorum</i> MDC72	12,7
<i>Aeromonas popoffii</i> CECT 5176	10,6	<i>Aeromonas molluscorum</i> MDC43	12,8
<i>Aeromonas popoffii</i> MDC 15	10,8	<i>Aeromonas simiae</i> MDC 2374	14,8
<i>Aeromonas bestiarum</i> ATCC 23213	9,7	<i>Aeromonas simiae</i> CIP 107798	14,8
<i>Aeromonas bestiarum</i> LMG 13662	10,0	<i>Aeromonas simiae</i> MDC 55	14,8
<i>Aeromonas bestiarum</i> LMG 13448	9,7	<i>Aeromonas simiae</i> MDC 54	14,8
<i>Aeromonas bestiarum</i> LMG 14045	9,7	<i>Aeromonas diversa</i> MDC 2583	14,3
<i>Aeromonas bestiarum</i> CECT 5741	10,3	<i>Aeromonas diversa</i> CECT 4254T-G501	14,2
<i>Aeromonas bestiarum</i> AE238	9,9	<i>Aeromonas schubertii</i> CECT 4240	14,0
<i>Aeromonas piscicola</i> AH-3	10,4	<i>Aeromonas schubertii</i> MDC 574	13,5
<i>Aeromonas piscicola</i> TC1	10,3	<i>Aeromonas sanarellii</i> A2-67	8,3
<i>Aeromonas piscicola</i> R94	10,3	<i>Aeromonas taiwanensis</i> A2-50	9,1

4.3.3 Estimativa de DL₅₀ de *A. dhakensis* para *P. mesopotamicus*

A virulência da cepa isolada de *A. dhakensis* foi avaliada com base na dose letal para 50% dos peixes infectados.

Para a determinação das doses que seriam inoculadas nos peixes, o número de UFC/mL de uma cultura expandida até atingir uma DO de 0,8 a 600 nm em meio TSB+ampicilina. Essa cultura foi diluída de forma seriada de 10⁻¹ a 10⁻⁵ e inoculada em placas de TSB para contagem de colônias. Porém, as diluições de 10⁻¹ a 10⁻³ produziram um número muito grande de colônias, o que impossibilitou a contagem. As placas da diluição de 10⁻⁶ produziram uma média de 40 colônias em 0,1 mL inoculados, o que representou 4,0 × 10² UFC/mL. Considerando-se o fator de diluição de 10⁻⁶ temos que a cultura original possuía 4,0 × 10⁸ UFC/mL. As placas da diluição de 10⁻⁵ produziram uma média de 272 colônias em 0,1 mL inoculados, o que representou 2,7 × 10³ UFC/mL. Considerando-se o fator de diluição de 10⁻⁵ temos que a cultura original possuía 2,7 × 10⁸ UFC/mL. Como as duas diluições produziram colônias dentro dos valores aceitáveis entre 30 e 300 colônias, a determinação da concentração da cultura original com DO de 0,8 a 600 nm foi obtida a partir da média dos resultados das duas diluições, o que representou um valor de 3,4 × 10⁸ UFC/mL.

Após a infecção experimental dos peixes com as doses de *A. dhakensis*, as primeiras mortes foram observadas cerca de 8h pós-infecção para a dose mais concentrada, de 3,4 × 10⁷ UFC/peixe, e todas as demais mortes ocorreram dentro de um período de 48h. Após 48h pós-infecção, nenhuma morte foi observada. Os dados de mortalidade estão apresentados na tabela 5.

Os sinais clínicos observados foram similares aos observados no peixe naturalmente infectado do qual a bactéria foi originalmente isolada, incluindo focos

hemorrágicos nos olhos, brânquias, nadadeiras, região anal e órgãos internos, bem como inchaço abdominal, natação errática e escurecimento da pele (Figura 6).

Tabela 5. Dados de mortalidade observados em *P. mesopotamicus* no experimento de dose letal média (DL₅₀).

Dose de bactérias (CFU/fish)	No. de animais		Valores acumulados			Mortalidade	
	Mortalidade	Sobreviventes	Mortalidade ^a (A)	Sobreviventes ^b (B)	Total (A+B)	Razão	%
3.4×10^7	30	0	89	0	89	89/89	100
3.4×10^6	30	0	59	0	59	59/59	100
3.4×10^5	23	7	29	7	36	29/36	80,5
3.4×10^4	6	24	6	31	37	6/37	16,2
3.4×10^3	0	30	0	61	61	0/61	0

^aSoma a partir do topo.

^bSoma a partir de baixo.



Figura 6. Exemplar de *P. mesopotamicus* infectado por injeção intraperitoneal com *A. dhakensis*. Note os focos hemorrágicos nos olhos, brânquias, nadadeiras e região anal (setas) e inchaço abdominal (estrela).

O cálculo da DL₅₀, de acordo com os métodos descritos por REED; MUENCH (1938), foi obtido primeiramente calculando-se a distância proporcional entre as diluições que obtiveram porcentagens de óbitos logo acima e logo abaixo de 50% aplicando-se a fórmula a seguir:

$$\frac{(\% \text{ mortalidade acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ mortalidade acima de } 50\%) - (\% \text{ mortalidade abaixo de } 50\%)} = \text{distância proporcional}$$

Assim temos que a distância proporcional é:

$$\frac{80,5\% - 50\%}{80,5\% - 16,2\%} = 0,5$$

O valor da distância proporcional entre as porcentagens de mortalidade logo acima e logo abaixo de 50% foi multiplicado por 1 (valor do log 10, que foi o fator de diluição utilizado no experimento) e somado com o fator de diluição da dose que produziu taxa de mortalidade logo acima de 50%, obteve-se o log da diluição responsável por produzir uma letalidade de 50% (DL₅₀), da seguinte maneira:

$$(0,5 \times 1) + 2 = 2,5$$

Dessa forma, a diluição da cultura original a $3,4 \times 10^8$ UFC/mL deverá ser feita em fator de $10^{-2,5}$, o que representa que a DL₅₀ da cepa isolada de *A. dhakensis* para *P. mesopotamicus* é aproximadamente $3,4 \times 10^{5,5}$ ou $1,1 \times 10^6$ UFC/mL. Como os peixes foram infectados com um volume de 0,1 mL, o valor aproximado da DL₅₀ foi de $1,1 \times 10^5$ UFC/peixe.

4.4 DISCUSSÃO

Embora *Aeromonas* spp. sejam geralmente patógenos oportunistas em peixes, a investigação microbiológica do agente patogênico responsável por causar septicemia hemorrágica aguda em um alevino de *P. mesopotamicus* obtido da piscicultura do CEPTA/ICMBio revelou que um único patógeno, identificado como sendo a bactéria *A. dhakensis*, estava infectando o peixe doente.

A identificação inicial, baseada em testes bioquímicos realizados pelo sistema de identificação automatizado VITEK 2, utilizando-se um conjunto de 47 provas bioquímicas, identificou com sucesso a bactéria isolada até o nível de gênero. Entretanto, o sistema identificou a cepa isolada como sendo da espécie *A. hydrophila* com um grau de confiabilidade de 98%, recebendo a classificação de “identificação excelente” pelo sistema, identificação que se mostrou incorreta após as análises moleculares.

O gênero *Aeromonas* é conhecido por conter cepas que são difíceis de diferenciar entre si, especialmente quando apenas métodos fenotípicos são empregados (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; FIGUERAS; BEAZ-HIDALGO, 2015). Portanto, a fim de confirmar o diagnóstico obtido a partir dos testes bioquímicos, foram realizadas análises de sequenciamento de DNA e filogenia molecular, utilizando-se os genes *housekeeping* 16S rRNA, *gyrB* e *rpoD*. As sequências obtidas foram então submetidas a análise pela busca BLAST, que revelou a cepa isolada era molecularmente mais próxima a cepas de *A. dhakensis* do que das de *A. hydrophila*, como sugeriam os testes bioquímicos. Isso demonstrou que o banco de dados utilizado para a identificação fenotípica foi incapaz de diferenciar entre as espécies *A. dhakensis* e *A. hydrophila*.

A partir das sequências dos genes 16S rRNA, gyrB e rpoD, foram realizados alinhamentos comparando esses genes da cepa isolada com várias cepas bem caracterizadas de várias espécies de *Aeromonas* disponíveis no GenBank. A partir desses alinhamentos, as sequências dos genes gyrB e rpoD foram concatenadas e utilizadas para produzir uma tabela de variação entre as sequências em relação ao número de substituições observadas nas sequências de cada cepa.

As distâncias entre a cepa isolada e as cepas de *A. dhakensis* analisadas variou entre 1,0 e 1,8% e foram consideradas intraespecíficas. As cepas de *A. hydrophila* foram as que apresentaram menores porcentagens de diferença (4,7 a 5,6%) comparadas com a cepa obtida no presente estudo, um resultado que era esperado considerando-se as similaridades fenotípicas entre as duas espécies. Essas porcentagens foram consideradas interespecíficas e estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores (MIÑANA-GALBIS et al., 2009; SOLER et al., 2004) e, dessa forma, confirmaram a identificação da cepa isolada no presente estudo como sendo *A. dhakensis*, e também confirmaram a identificação incorreta a nível de espécie do sistema VITEK 2 baseado em testes bioquímicos.

Esses dados corroboram os resultados observados por outros pesquisadores, que afirmam que a identificação de espécies de *Aeromonas* realizadas exclusivamente por métodos bioquímicos não é confiável, uma vez que tendem a identificar muitos isolados como sendo da espécie *A. hydrophila*, e causando uma subestimação da ocorrência de espécies menos comuns como *A. dhakensis*. Dessa forma, o uso de métodos mais precisos, como o sequenciamento de genes *housekeeping*, é necessário (BEAZ-HIDALGO et al., 2010; BEAZ-HIDALGO et al., 2013; FIGUERAS et al., 2009; FIGUERAS; BEAZ-HIDALGO, 2015; MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al., 2008; PEREZ et al., 2015).

Apesar da pouca variação genética observada entre a cepa sul-americana e outras cepas de *A. dhakensis*, uma diferença importante foi observada no alinhamento das sequências do gene *rpoD*, em uma região em particular do gene, responsável pela tradução de uma região de repetições curtas em tandem onde os ácido aspártico e ácido glutâmico são codificados de forma alternada. Nessa região, a cepa sul-americana apresentou uma inserção de 6 nucleotídeos, codificando um par a mais desses aminoácidos, o que não foi observado em nenhuma sequência de nenhuma outra cepa de *A. dhakensis* ou da espécie mais proximamente relacionada, *A. hydrophila*. Isso indica uma característica genética particular que diferencia a cepa de *A. dhakensis* encontrada no Brasil das outras já descritas no mundo.

As árvores filogenéticas resultantes mostraram que a cepa sul-americana agrupou em um clado composto exclusivamente de cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* e *A. aquariorum*, confirmando pertencer, de fato, à espécie *A. dhakensis* e não *A. hydrophila*.

O clado composto por cepas de *A. dhakensis* se posicionou próximo ao clado composto por cepas de *A. hydrophila*, confirmando que essas duas espécies que muitas vezes são equivocadamente identificadas são muito similares. Porém, uma clara separação entre as duas espécies foi observada, o que está de acordo com as filogenias produzidas por outros autores (BEAZ-HIDALGO et al., 2013; MARTINEZ-MURCIA, A. et al., 2009; MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al., 2011; PEREZ et al., 2015).

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *A. dhakensis* obtido no sistema VITEK 2 revelou a resistência a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina e meropenem. A resistência a ampicilina e a ampicilina/sulbactam é uma característica que já era esperada, uma vez que sabe-se que a maioria das espécies do gênero *Aeromonas* possuem resistência intrínseca a aminopenicilinas, independente da fonte de

isolamento (ABBOTT et al., 2003; JANDA; ABBOTT, 2010). A ocorrência de cepas de *A. dhakensis* (ainda referida como *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* e *A. aquariorum*) resistentes a cefoxitina também foi relatada por ESTEVE et al. (2012) e FIGUERAS et al. (2009), corroborando os dados observados no presente estudo para a cepa sul-americana.

A resistência a meropenem, por outro lado, é algo notável, já que a maioria de *Aeromonas* spp. são sensíveis a antibióticos da classe dos carbapenems (ADLER et al., 2014; HUANG et al., 2015; LIU, Y. et al., 2013; PEREZ et al., 2015; YUCEL; ERDOGAN, 2010), e apenas poucas cepas já foram relatadas como sendo resistentes a essa classe de antibióticos (CASTELO-BRANCO DDE et al., 2015; FIGUEIRA et al., 2011). A cepa do presente estudo não foi, entretanto, totalmente resistente a carbapenems, uma vez que a cepa foi sensível ao imipenem. Mais estudos seriam necessários para entender os mecanismos envolvidos em tal diferença de susceptibilidade entre dois antibióticos da mesma classe nessa cepa em particular. Porém, como observado por PRIDGEON; KLESIUS (2011) para *Pseudomonas aeruginosa*, isso pode ser devido a mecanismos não enzimáticos, incluindo alterações em proteínas da membrana externa das células, como a perda da porina OprD e o aumento da atividade das bombas de efluxo. Essas alterações podem reduzir a concentração de antibiótico dentro do periplasma causando, em parte, o surgimento da resistência a alguns carbapenems (MAMMERI et al., 2010). Todos os outros antibióticos testados, incluindo cefalosporinas (de segunda, terceira e quarta gerações), aminoglicosídeos, quinolonas, glicilciclinas e polipeptídeos, foram altamente inibitórios contra a cepa isolada de *A. dhakensis*.

A virulência de *A. dhakensis* para *P. mesopotamicus* foi avaliada através do cálculo da dose letal média dos peixes infectados experimentalmente. Nas doses mais

altas, peixes começaram a morrer por volta de 8h pós-infecção e, após 48h, nenhuma mortalidade foi observada. Isso indica que, para os peixes susceptíveis à bactéria (59,33% dos peixes infectados), essa cepa se mostrou altamente virulenta. Entretanto, os peixes que foram capazes de sobreviver à fase aguda inicial da infecção (40,66% dos peixes infectados) não apresentaram nenhum sinal clínico de infecção ao longo dos 14 dias de observação. Esses dados estão de acordo com o que foi observado por PRIDGEON; KLESIUS (2011) em um experimento de desafio com *A. hydrophila* no bagre *Ictalurus punctatus*.

Com um valor de DL_{50} de $1,1 \times 10^5$ UFC/peixe, a cepa sul-americana de *A. dhakensis* foi considerada altamente virulenta, de acordo com a escala de virulência descrita por ESTEVE; ALCAIDE (2009), onde cepas podem ser classificadas como extremamente virulentas (DL_{50} inferior a 10^4 UFC/peixe), altamente virulentas (DL_{50} entre 10^4 e 10^6 UFC/peixe), moderadamente virulentas (DL_{50} entre 10^6 e 10^8 UFC/peixe) e avirulentas (DL_{50} superior a 10^8 UFC/peixe).

O único relato de um experimento de virulência para *A. dhakensis* em peixes encontrado na literatura pesquisada, foi realizado por ESTEVE et al. (2012), que observaram valores de DL_{50} de $2,6 \times 10^5$ a $3,3 \times 10^6$ UFC/peixe em desafios utilizando enguias (*Anguilla anguilla*). Em um estudo de DL_{50} com células neutrofílicas humanas cultivadas *in vitro*, *A. dhakensis* (ainda referida como *A. aquariorum*) mostrou a maior citotoxicidade em comparação a cepas de *A. hydrophila* e *Aeromonas caviae* (MORINAGA et al., 2013). Em outro estudo, embora um valor de DL_{50} não tenha sido fornecido, uma cepa de *A. dhakensis* foi relatada como sendo moderadamente virulenta para trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) desafiadas, causando septicemia hemorrágica generalizada (OROZOVA et al., 2009).

A. dhakensis está emergindo como uma das espécies mais prevalentes de *Aeromonas* patogênicas (FIGUERAS; BEAZ-HIDALGO, 2015), uma vez que possui distribuição global e grande importância como agente etiológico de septicemia em peixes, além de ser uma ameaça potencial a humanos. Essa espécie já foi relatada em vários ambientes aquáticos e casos clínicos ao redor do mundo, incluindo Europa, África, Ásia, Austrália e México, com alguns estudos relatando prevalências mais altas que as espécies de *Aeromonas* com ocorrência mais comum (como *A. hydrophila*, *A. caviae* e *Aeromonas veronii* bv. *sobria*) (ARAVENA-ROMAN et al., 2014; CHEN et al., 2014; FIGUERAS; BEAZ-HIDALGO, 2015; GHENGHESH et al., 2014; HUYS et al., 2002; JANDA et al., 1994; MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al., 2008; MORINAGA et al., 2013; PEREZ et al., 2015; SOTO-RODRIGUEZ et al., 2013; WU et al., 2015). O presente estudo é o primeiro relato identificando *A. dhakensis* como agente patogênico de septicemia hemorrágica aguda em uma espécie de peixe da América do Sul, fornecendo um importante dado epidemiológico, além de fornecer uma extensa caracterização fenotípica e molecular dessa que é uma das mais importantes espécies de *Aeromonas*.

5. CAPÍTULO II – Caracterização e análise da expressão dos genes *Arg1*, *Arg2* e *iNOS* de *P. mesopotamicus* em resposta à infecção por *A. dhakensis*

5.1 INTRODUÇÃO

Macrófagos fazem parte do sistema imunológico inato e são, geralmente, um dos primeiros tipos celulares recrutados para combater patógenos em vertebrados, orquestrando as respostas imunológicas apropriadas. A ativação dessas células em peixes teleósteos pode ocorrer por duas vias distintas, conhecidas como via clássica (macrófagos M1) e via alternativa (macrófagos M2). Essas duas vias de ativação já são bem caracterizadas em mamíferos, porém, os mecanismos responsáveis por esses eventos foram elucidados para apenas algumas espécies de peixes. Um fato intrigante é que, tanto similaridades quanto diferenças em relação a mamíferos foram observadas nesses estudos com outros vertebrados (HODGKINSON; GRAYFER; BELOSEVIC, 2015).

Em peixes teleósteos, a via de ativação dos macrófagos melhor caracterizada é a via clássica. Macrófagos M1 possuem importante papel na proteção do hospedeiro contra patógenos, que são rapidamente destruídos por mecanismos como fagocitose e produção de reativos tóxicos, como o óxido nítrico (NO) (NEUMANN; STAFFORD; BELOSEVIC, 2000), acidificação fagolisossomal (RIEGER; HALL; BARREDA, 2010) e restrição da oferta de nutrientes (GRAYFER; HODGKINSON; BELOSEVIC, 2014). Acredita-se que macrófagos M1 são ativados por citocinas pró-inflamatórias derivadas de linfócitos T *heper* 1 (T_H1), principalmente interferon gama (INF- γ).

A ativação de macrófagos M1 pode ser estimulada pelo sistema imunológico inato pela ação de diversos estimulantes, sendo que o que tem efeitos melhor caracterizados é o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. Estudos mostram que a

estimulação *in vitro* de macrófagos de peixes com LPS leva a um aumento na atividade de explosão respiratória associada à produção de espécies de oxigênio, NO e à secreção de citocinas pró-inflamatórias (RIEGER; BARREDA, 2011). Também já foi demonstrado que o uso de INF- γ recombinante, utilizado isoladamente ou em combinação com LPS, provoca um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e iNOS, aumentando a atividade de explosão respiratória e a produção de NO (ARTS et al., 2010; YANG et al., 2013).

Uma vez ativados, os macrófagos M1 são caracterizados pela capacidade de destruir patógenos intracelulares, em um estado gerado e mantido por uma série de citocinas pró-inflamatórias, como o próprio INF- γ , bem como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (GORDON, 2007). A produção de NO e de espécies reativas de oxigênio é o que caracteriza o estado de macrófagos M1, fazendo com que o gene da enzima iNOS seja um excelente marcador para a identificação desse tipo de macrófagos em peixes.

Mais recentemente, vários esforços tem sido feitos para caracterizar o estado de ativação alternativo dos macrófagos em peixes teleósteos. Os macrófagos M2 podem ser geralmente caracterizados por possuir um fenótipo anti-inflamatório, que é ativado na presença de citocinas derivadas de linfócitos T *heper* 2 (T_H2), principalmente IL-4 e/ou IL-13 (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Tipicamente, esses macrófagos apresentam elevada atividade da enzima arginase e produzem importantes proteínas para o processo de cura, incluindo a geração de matriz extracelular e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) importantes para o crescimento e divisão celular (WIEGERTJES et al., 2016).

A principal separação entre macrófagos ativados pela via clássica em relação aos ativados pela via alternativa envolve o metabolismo de L-arginina. Enquanto a enzima iNOS dos macrófagos M1 converte L-arginina em L-citrulina e NO, macrófagos M2

utilizam a atividade enzimática da arginase para competir com a iNOS e converter o mesmo substrato em L-ornitina e ureia no ciclo ornitina-ureia (OUC), contrabalanceando a atividade dos macrófagos M1 (BARKSDALE et al., 2004; INIESTA et al., 2002; WIEGERTJES et al., 2016).

Apesar de ter como principal função a síntese de ureia pelo OUC, essa enzima não é exclusiva de organismos ureotélicos, sendo amplamente observada ao longo de todo o espectro de organismos vivos (SRIVASTAVA; RATHA, 2013). A maioria dos vertebrados apresentam uma duplicação no gene responsável pela codificação dessa enzima, dando origem a duas isoformas, sendo uma citosólica denominada de Arg1, e outra mitocondrial, denominada Arg2, amplamente distribuída por vários tipos celulares e com diferentes níveis de expressão (JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996).

Em mamíferos, a isoforma Arg1 que apresenta maior expressão em macrófagos M2 gerando uma diminuição na oferta de arginina intracelular para a enzima iNOS, sendo essa a isoforma que contrabalança o desenvolvimento de macrófagos M1 (RATH et al., 2014). Já em peixes, JOERINK; SAVELKOUL; WIEGERTJES (2006) demonstraram em seu estudo com carpa (*Cyprinus carpio* L.) que, ao contrário do que ocorre em mamíferos, em peixes, a isoforma Arg2 e não Arg1 que é diferencialmente regulada e está provavelmente envolvida na ativação de macrófagos M2.

A maneira mais utilizada atualmente para avaliar o balanço entre macrófagos M1 e M2 é através de análises de expressão dos genes iNOS e arginase (em suas duas isoformas) representando, respectivamente as vias de ativação clássica e alternativa (PELLIZZARI et al., 2013; SEVERIN; SOLIMAN; EL-MATBOULI, 2010; WIEGERTJES et al., 2016). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e analisar a expressão dos genes das enzimas Arg1, Ar2 e iNOS de *P.*

mesopotamicus infectados experimentalmente pela cepa sul-americana da bactéria *A. dhakensis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Caracterização molecular dos peixes

Dentre os chamados “peixes redondos”, membros da família Serrasalminidae, as espécies pacu (*P. mesopotamicus*), pirapitinga (*Piaractus brachipomus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), são as que possuem maior representatividade na aquicultura nacional (MPA, 2013). Essas espécies são comumente cruzadas entre si a fim de produzir híbridos que possuem melhor produtividade, são de mais fácil manejo, e muitas vezes são mais vantajosas para os produtores em relação às espécies puras (CALCAGNOTTO et al., 1999; GOMES; SIMÕES; ARAUJO-LIMA, 2010; PINHEIRO et al., 1991). Como já foi demonstrado por HASHIMOTO et al. (2014), peixes adquiridos em pisciculturas comerciais nem sempre representam as espécies pelas quais são comercializadas. Portanto, antes do início dos experimentos do presente trabalho, os peixes utilizados foram avaliados molecularmente para garantir que os exemplares adquiridos eram puros da espécie de interesse.

Para isso, além dos exemplares de *P. mesopotamicus* que seriam utilizados nos experimentos, exemplares de pirapitinga, tambaqui e do híbrido “tambacu” (gerado a partir do cruzamento da fêmea de *C. macropomum* e o macho de *P. mesopotamicus*), obtidos da mesma piscicultura comercial, foram submetidos a análises moleculares do gene α -tropomiosina, como descrito por HASHIMOTO et al. (2011), e comparados entre si a fim de determinar a ocorrência de hibridização nos peixes do grupo experimental.

Fragmentos da nadadeira dorsal de 5 exemplares de cada espécie foram coletados e individualmente submetidos a extração de DNA com o Wizard® Genomic DNA

Purification kit (QIAGEN, USA) seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm e sua pureza avaliada a partir da razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e amostras com valores próximos a 1,8 foram consideradas puras.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com um volume final de 25 μ L contendo 10–50 ng de DNA genômico, 2,5 μ L de 10X DreamTaq Green buffer (Thermo Scientific), 0,5 μ L de de cada uma das dNTPs (0,2 mM) (Invitrogen), 0,5 μ L dos *primers* TROP F (5' CGGTCAGCCTCTTCAGCAATGTGCTT 3') e TROP R (5' GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG 3') (0,2 μ M) (FRIESEN et al., 1999), 0,25 μ L de DreamTaq Green DNA polimerase (1,25 U) (Thermo Scientific) e água ultra pura (MilliQ).

A amplificação foi realizada no termociclador AG 22331 Hamburg Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) com um programa que consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 segundos precedidos por desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos e sucedidos por uma extensão final a 72°C por 3 minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o tamanho das bandas foi comparado com o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Os *amplicons* foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e sequenciados utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA) utilizando-se os mesmos *primers* usados nas reações de amplificação.

As sequências foram visualizadas, montadas e editadas com o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). Para cada sequência, uma busca através da ferramenta

nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) foi realizada no website do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar que os genes foram corretamente amplificados e sequenciados.

As sequências parciais do gene α -tropomiosina obtidas para cada grupo foram alinhadas e comparadas entre si e com as sequências das espécies puras obtidas por HASHIMOTO et al. (2011) a partir de peixes do estoque do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMbio) (números de acesso do GenBank HQ420878 a HQ420892).

5.2.2 Infecção experimental

100 alevinos de *P. mesopotamicus* oriundos de um única desova, pesando de 30 a 45 g foram obtidos de uma piscicultura comercial do estado de São Paulo e mantidos em 10 aquários de 60 L de água da torneira desclorada com aeração constantes na densidade de 10 peixes por aquário. A cada dois dias, metade da água dos aquários foi sifonada para remoção de restos de matéria fecal e substituída por água da torneira desclorada. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial para alevinos. Após um período de aclimação de duas semanas os peixes foram submetidos à infecção experimental com a cepa isolada de *A. dhakensis*. 48 horas antes da infecção experimental a alimentação dos peixes foi interrompida e foi evitado qualquer tipo de manejo que pudesse provocar estresse nos animais.

Para a infecção, a cepa de *A. dhakensis* isolada foi cultivada por 24h a 30°C em meio TSB+ampicilina até que atingisse uma DO de 0,8 medida a 600 nm no espectrofotômetro Hitachi 2810U, o que representava uma concentração de

aproximadamente $3,4 \times 10^8$ UFC/mL. Essa cultura foi diluída de forma que os peixes foram infectados com uma dose de $4,4 \times 10^4$ UFC/peixe, o que representou a DL_{20} . Dessa forma, 50 peixes, sendo 10 por aquário, foram infectados com $4,4 \times 10^4$ UFC diluídos em 0,1 mL de solução salina de NaCl a 0,9% estéril injetados intraperitonealmente. Outros 50 peixes foram tratados da mesma forma, porém, inoculados com 0,1 mL apenas de solução salina, constituindo o grupo controle.

Logo após a infecção, no tempo 0, dois peixes de cada um dos 5 aquários infectados, e dois peixes de cada um dos 5 aquários controle foram eutanasiados por overdose de benzocaína. Fragmentos de fígado, baço e rim anterior de cada peixe foram coletados assepticamente e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Essa coleta foi realizada da mesma maneira nos períodos de 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção. Durante o período experimental, 5 peixes do grupo infectado morreram após a infecção, diminuindo o número amostral para 45 animais. Desses, 40 (8 peixes para cada período pós-infecção) foram submetidos à extração de RNA e síntese de cDNA. Para o grupo controle, o número de peixes em que foi realizada a extração de RNA e síntese de cDNA foi o mesmo. Todo o material coletado foi mantido a -80°C até a realização da extração de RNA.

5.2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o método com TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

O RNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) através da leitura de absorbância a 260 nm, e sua pureza foi determinada

calculando-se a razão das absorvâncias medidas a 260 e 280 nm (razão 260/280). Razões 260/280 próximas de 2,0 foram consideradas com grau de pureza aceitável.

Para verificar a integridade dos RNAs, uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE foi realizada a fim de verificar a ocorrência de duas bandas claras e bem definidas que representam as subunidades 18S e 28S do rRNA, indicando que os mRNAs não estavam degradados.

Antes da transcrição reversa, a fim de diminuir a influência de uma possível contaminação por DNA genômico (gDNA) nas reações de qPCR, 1,0 µg do RNA de cada amostra foi tratada com a enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Para a síntese do cDNA, o RNA tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o kit High Capacity (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante.

5.2.4 Caracterização dos genes Arg-1, Arg-2 e iNOS de *P. mesopotamicus*

Como não existia na literatura a caracterização dos genes em estudo de *P. mesopotamicus*, os *primers* utilizados para amplificação inicial foram obtidos a partir de regiões conservadas das sequências de várias outras espécies de peixes disponíveis no GenBank. Para o gene Arg1, as sequências foram alinhadas pelo programa ClustalW e os *primers* foram desenhados em regiões aparentemente conservadas do gene. Para o gene Arg2, os *primers* descritos por JOERINK et al. (2006) amplificaram com sucesso esse gene em *P. mesopotamicus*. Para o gene iNOS, nenhum par de *primers* descritos na literatura ou mesmo *primers* desenhados a partir de regiões aparentemente conservadas em outras espécies de peixe, produziram o fragmento esperado nas reações de PCR.

Para obter a sequência desse gene, foi feita uma parceria com o pesquisador Dr. Alexandre Rodrigues Caetano da EMBRAPA de Brasília que atualmente está trabalhando na montagem do genoma completo do tambaqui (*C. macropomum*). Embora a montagem final do genoma ainda não esteja concluída, o Dr. Caetano foi capaz de buscar em seu banco de dados o fragmento genômico do gene iNOS, que foi editada para a remoção dos íntrons utilizando-se o programa GenomeScan (YEH; LIM; BURGE, 2001) para se obter a sequência prevista do mRNA de iNOS de *C. macropomum*. Como os peixes *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* são filogeneticamente muito próximos, os *primers* desenhados a partir da sequência de tambaqui amplificaram com sucesso a região desejada em pacu.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador AG 22331 Hamburg Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) e constituíram de 10-50 ng de cDNA, 2,5 µL de 10X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, EUA), 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,5 µL de cada *primer* (0,2 µM), 0,25 µL de DreamTaq DNA Polymerase (ThermoScientific, EUA) e água ultrapura para um volume final de 25 µL. O programa da PCR consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C a 60 segundos, precedidos por um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e sucedidos por uma extensão terminal a 72°C por 3 minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o tamanho das bandas foi comparado com o padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Os *amplicons* foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e sequenciados utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, EUA) com os

mesmos pares de *primers* utilizados na amplificação. Os detalhes e sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento estão sumarizados na Tabela 6.

As sequências foram visualizadas, montadas e editadas com o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). Para cada sequência, uma busca através da ferramenta nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) foi realizada no website do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar que os genes foram corretamente amplificados e sequenciados.

As sequências parciais dos genes Arg1, Arg2 e iNOS foram traduzidas para sequências de aminoácidos utilizando-se o programa BioEdit e então alinhadas com as sequências de outras espécies de peixes e com a sequência de humanos utilizando-se o programa ClustalW para verificar a existência de domínios conservados e regiões características das enzimas.

Tabela 6. *Primers* utilizados para amplificação inicial, sequenciamento e análise da expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de *P. mesopotamicus*.

Gene	<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto	Referência
Arg1	Arg1F1*	TGATGCTGGGAGGAGAYCACAG	559 pb	Presente estudo
	Arg1R1*	CTTHGGGTTTCACDTCSACCATGTC		
	Arg1F2**	GTTTAGCAATCGGCTCAATCCAC	145 pb	Presente estudo
	Arg1R2**	GTGGATGAGGTAAGACATGGGC		
Arg2	Arginase2fw1*	GGAGCTCCGTTTTCCAAAGGA	521 pb	(JOERINK et al., 2006)
	Arginase2rv1*	TGGATCCACATCTCTAAGACCAATG		(JOERINK et al., 2006)
	Arg2F2**	CTTGGCCATTGGCTCAGTGGAA	144 pb	Presente estudo
iNOS	Arg2R2**	TTTGAGCATGAATGCCACGGCT		Presente estudo
	iNOSF1*	TTGATGCACGCAAATGCAAAAC	557 pb	Presente estudo
	iNOSR1*	TCGACCAACTTTCTCCAGGATG		Presente estudo
	iNOSF2**	TGGCTATCAGATGGAAGATGGC	102 pb	Presente estudo
	iNOSR2**	AAGAGGCCATACTTTGGTGTCC		Presente estudo
18S	18SF**	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	45 pb	(BRESSAN et al., 2011)
	18SR**	CTGTCAATCCTGTCCGTGTC		(BRESSAN et al., 2011)
β act	BactF**	TCACAGAGGCTCCCCTGAAC	64 pb	(GUTIERREZ DE PAULA et al., 2014)
	BactR**	CTCAAACATGATCTGGGTCATCT		

**Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento

***Primers* utilizados para qPCR

5.2.5 Análise da expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de *P. mesopotamicus*

Para as análises de expressão, foram utilizados os cDNAs de 5 peixes de cada grupo (infectado e controle) em cada um dos 5 períodos pós-infecção (0, 12, 24 e 48 h).

A determinação dos níveis de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS em *P. mesopotamicus* foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (PCR quantitativo) (qPCR). Para isso foram desenhados *primers* específicos para cada gene baseados nas sequências parciais obtidas.

Os genes Arg1 e Arg2 são genes responsáveis por codificar isoformas da mesma enzima e que possuem sequências de DNA com grande semelhança entre si. Dessa forma, os *primers* para qPCR foram desenhados em regiões específicas de cada isoforma, a fim de se evitar ampliações inespecíficas.

Como genes de controle endógeno para as análises de expressão relativa, foram utilizados os genes constitutivos 18S rRNA e β -actina (Tabela 7). Para o 18S rRNA foram utilizados *primers* universais para eucariotos, e para β -actina foram utilizados os *primers* já descritos para *P. mesopotamicus* por GUTIERREZ DE PAULA et al. (2014).

Cada par de *primers* foi padronizado a fim de determinar sua concentração garantindo sua máxima eficiência e para evitar a formação de estruturas secundárias (dímeros) que pudessem interferir nas reações. A eficiência dos pares de *primers*, tanto dos genes alvos quanto dos controles endógenos, foi calculada a partir de curva padrão realizada com 6 diluições seriadas de 1:2 de cDNA seguindo a fórmula $E=10^{(-1/\text{slope})}$. Todos os *primers* utilizados nesse estudo apresentaram eficiências entre 98 e 102% e foram consideradas como 100% nas análises de expressão relativa.

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata com um volume final de 10 μ L contendo 5 μ L de SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), 50-100 nM de

cada *primer* (50 nM para Arg1 e 100 nM para os demais), 20 ng de cDNA e água ultrapura para completar o volume final de 10 µL. Foi utilizado o modo de ciclagem *Fast*, que consistiu de 2 minutos a 50°C para ativação da enzima uracil-DNA glycosylase (UDG), 2 minutos a 95°C de desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C por 30 segundos, no equipamento QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para verificar a presença de produtos inespecíficos ou possíveis contaminações, reações controle sem cDNA foram realizadas em cada análise de qPCR.

Imediatamente após cada etapa de amplificação, foi realizada uma curva de dissociação dos produtos obtidos para verificar a ocorrência de ligação inespecífica ou dímeros dos *primers*, utilizando uma taxa de elevação de temperatura de 0,5°C/30s entre 55-95°C. Os dados relativos aos ciclos em que as amostras alcançaram o *threshold* (Ct) foram coletados no passo de hibridização/extensão.

Para garantir que o desenho dos *primers* foi feito corretamente e que não havia amplificação inespecífica, uma reação teste foi realizada onde os *primers forward* de cada isoforma foram combinados com os *reverse* da outra isoforma. A ausência de amplificação indicou que os *primers* desenhados eram, de fato, específico para cada gene. Além disso, o produto dos qPCRs dos 3 genes em estudo foram sequenciados seguindo o mesmo protocolo descrito acima e comparados com as sequências iniciais para confirmar a especificidade das amplificações. A Figura 7 mostra que as amplificações dos genes Arg1 e Arg2 produziram fragmentos apenas das isoformas para qual os *primers* foram desenhados, sem a ocorrência de amplificação inespecífica.

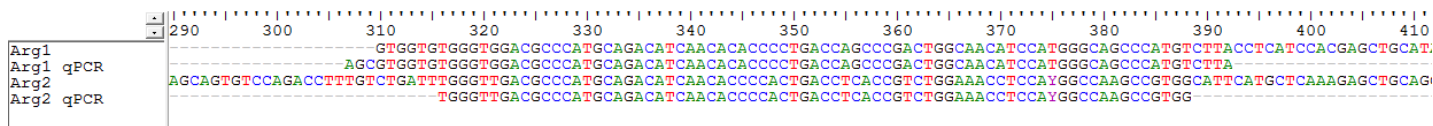


Figura 7. Comparação das sequências obtidas a partir das ampliações com os *primers* desenhados para qPCR em relação às sequências iniciais de Arg1 e Arg2, onde pode-se verificar que as ampliações são específicas para cada isoforma.

Os dados dos ciclos no qual as reações atingiram o limiar da fase exponencial ou *Threshold Cycle* (Ct) nas reações de qPCR dos genes alvo (Arg1, Arg2 e iNOS) foram normalizados (ΔCt) pela média geométrica dos Cts dos genes de referência endógenos (18S rRNA e β -actina). Os dados normalizados foram utilizados para calcular a expressão relativa pelo algoritmo $2^{-\Delta Ct}$.

5.2.6 Análise estatística

As análises foram realizada a fim de se comparar os perfis de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS em cada órgão, obtidos nos grupo infectado em relação ao grupo controle em cada um dos períodos pós-infecção de forma isolada. O efeito do tempo dentro de cada grupo não foi considerado, uma vez que já foi demonstrado que mesmo lesões assépticas, como a injeção de solução salina estéril realizada no grupo controle, pode ocasionar o recrutamento de macrófagos e expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (NGUYEN-CHI et al., 2015), o que poderia interferir na expressão dos genes em análise no presente trabalho.

As variáveis quantitativas dos experimentos de expressão gênica foram analisadas utilizando-se o programa SAS[®] University Edition. Os dados foram submetidas à análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (PROC UNIVARIATAE). As variáveis que não atenderam às premissas de normalidade foram

submetidas à transformação logarítmica ($\text{LOG}[X+1]$). Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). No caso de ocorrência de interações entre os grupos infectados e controle com o tempo, a análise foi segmentada usando-se o comando SLICE gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS) e, posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises estatísticas o nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Caracterização molecular dos peixes

As análises de amplificação e sequenciamento do gene α -tropomiosina das amostras dos 5 exemplares de pacu produziram seqüências idênticas, o que também ocorreu com os 5 exemplares examinados de tambaqui e de pirapitinga, demonstrando que os grupos analisados eram homogêneos, o que era esperado, considerado que os animais eram todos provenientes de uma única desova. Os exemplares de pacu produziram seqüências de 252 pb, os de tambaqui geraram seqüências de 242 pb, e os de pirapitinga 253 pb. Essas diferenças são explicadas pela ocorrência de *indel* (inserção ou deleção) na posição 88 das seqüências de nucleotídeos, onde as amostras de pirapitinga possuem o nucleotídeo adenina (A), que não foi observado nas amostras de pacu e tambaqui. Na posição 96, as amostras de pacu e pirapitinga possuíam a seqüência GGCATAAAGT, ausente nas amostras de tambaqui (Figura 8). Todas as seqüências obtidas para as 3 espécies foram idênticas às seqüências existentes no banco de dados do GenBank para esse gene. Códigos de acesso HQ420878 para pacu, AY817218 para tambaqui e HQ420883 para pirapitinga.

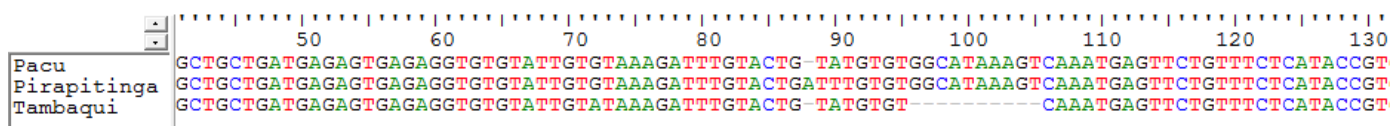


Figura 8. Comparação das seqüências do gene α -tropomiosina de pacu, pirapitinga e tambaqui mostrando a ocorrência de *indels* nas posições 88 e 96.

Os sequenciamentos das amostras de tambacu somente puderam ser analisados de maneira apropriada em uma região muito curta. Como os indivíduos híbridos possuem um alelo de pacu e outro de tambaqui para esse gene, quando a reação de sequenciamento atinge a posição em que existe um *indel*, ocorre sobreposição de bases não homólogas a partir desse ponto, gerando 2 picos sobrepostos no eletroferograma do sequenciamento. Embora esse fato impossibilite a análise completa das sequências, ele confirma que os exemplares analisados, constituíam uma espécie híbrida. Por se tratarem de peixes heterozigotos para esse gene, na região que pôde ser comparada, foi observada a sobreposição de picos no eletroferograma nas posições em que as espécies puras possuíam nucleotídeos diferentes (Figura 9).

Os resultados obtidos nessas análises confirmam que os peixes utilizados no presente trabalho eram, de fato, puros e da espécie *P. mesopotamicus*.

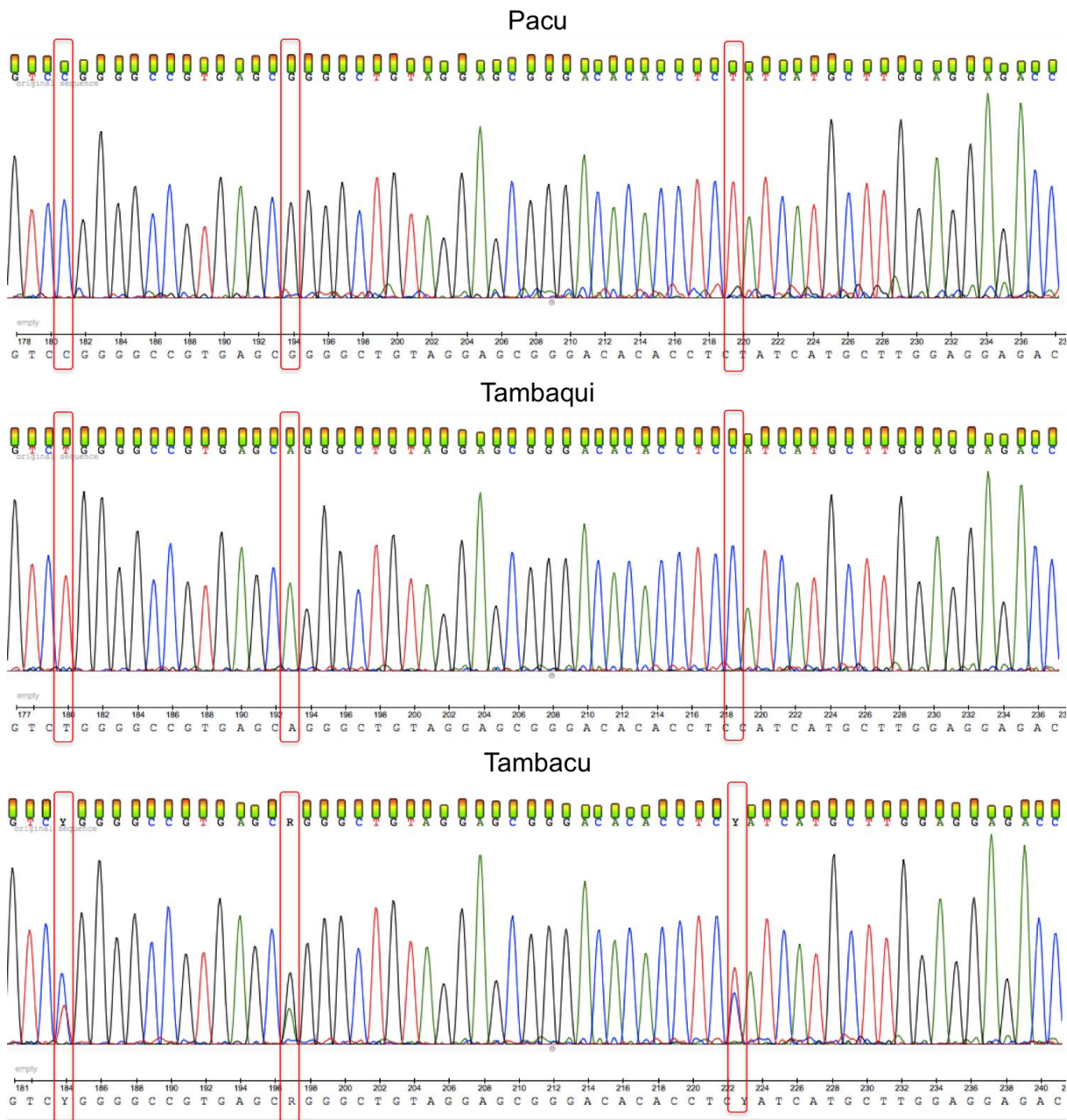


Figura 9. Comparação dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento do gene α -tropomiosina de pacu, tambaqui e do híbrido tambacu onde pode-se observar os locais de substituição de nucleotídeos entre as espécies puras e a presença de dois picos no sequenciamento da espécie híbrida, indicando a ocorrência de heterozigose.

5.3.2 Caracterização dos genes Arg1, Arg2 E iNOS de *P. mesopotamicus*

As análises de amplificação e sequenciamento dos genes Arg1, Arg2 e iNOS produziram sequências parciais com 471 pb, 488 pb e 513 pb respectivamente. Na comparação com outras sequências depositadas no GenBank através da busca BLAST, todas demonstraram alta similaridade com outras espécies de peixes. Essas sequências de nucleotídeos foram traduzidas e produziram sequências de 158 aa para Arg1, 162 aa para Arg2 e 170 aa para iNOS.

As sequências de nucleotídeos das duas isoformas de arginase foram comparadas entre si em 177 pb em que as sequências se encontraram, com diferenças em 55 pb, o que representou 31,1% de variação. As sequências de aminoácidos foram comparadas em 59 aa, mostrando 23 aa de diferença entre as isoformas, o que representou uma variação de 39%.

Na comparação com outras espécies, as sequências de aminoácidos das enzimas Arg1 e Arg2 mostraram regiões conservadas que representaram regiões características da família arginase, além dos resíduos de ligação dos dois íons de manganês (Mn^{2+} A e B) e de ligação com L-arginina (Figuras 10 e 11). Em relação às arginases humanas, a sequência parcial da isoforma Arg1 de *P. mesopotamicus* mostrou uma similaridade de 72,2% entre os aminoácidos comparados, e a isoforma Arg2 mostrou uma similaridade de 60,5%.

A sequência de aminoácidos obtida para a enzima iNOS mostrou alta similaridade com as sequências de outras espécies comparadas, incluindo uma similaridade de 78,2% com a proteína de humanos. Porém, não foi grande o suficiente para se observar nenhum resíduo conservado característico da enzima (Figura 12).

P.mesopotamicus_Arg2	-----KGQKRRGVVEYGPKAIRDAGLVERLTN	26
C.carpio_Arg2_CAF02014	MALRGPLSRLLRSTMSQCQNRSSQSVAILGAPFSKGQKRRGVVEHGPKAIRDAGLVERLSN	60
D.rerio_Arg2_NP955905	MAMRGPLSRLLKSTLTSCQQRNRSVAILGAPFSKGQKRRGVVEHGPKAIRDAGLVERLSN	60
E.lucius_Arg2_XP010877736	MALRGTLRLLRTPFSTTCQNRTHSVAVLGAPFSKGQKRRGVVEHGPKAIRDAGLIERLSN	60
H.sapiens_Arg2_NP001163	MSLRGSLRLLQTRVHSILKKSVMHSAVIGAPFSQKRRGVVEHGPAAREAGLMKRLSS	60
	:****:****:* ***:****:****:.	
P.mesopotamicus_Arg2	LEFPVHDFGDLRFQHLEKDDHFMHV--FFPRTVGRATQLVSGAVSGAVGAGHTS IMLGGDH	85
C.carpio_Arg2_CAF02014	LDYAVHDFGDLAFKHKLEKDEHFMHV--FFPRTVGRANQLLSGAVSGAVGAGHTC IMLGGDH	119
D.rerio_Arg2_NP955905	LDYPVHDFGDLTFKHKLEKDEHFMHV--FFPRTVGRANQLLSGAVSGAVGAGHTC IMLGGDH	119
E.lucius_Arg2_XP010877736	LDYPVHDFGDLRFQNLKDEPYMQV--FFPRSVGRANKLLSEAVSGAVSAGHTTVMMLGGDH	119
H.sapiens_Arg2_NP001163	LGCHLKDFGDLRFPPVKDDLNNLIVNPRSVGLANQELAEVVSRAVSDGYSCVTLGGDH	120
	* :*****: * : ** : : .: **** *.: : .*. ** .: : *****	
P.mesopotamicus_Arg2	SLAIGSVEGHAQCPCDLCLIWVDAHADINTPLTSPSGNLIHQAVAFMLKELQDKMPDVPG	145
C.carpio_Arg2_CAF02014	SLAIGSVEGHAQCPCDLCLIWVDAHADINTPLTSPSGNLIHQSVAFLLKDLQNKMPVEVPG	179
D.rerio_Arg2_NP955905	SLAIGSVEGHSQCPCDLCLIWVDAHADINTPLTSPSGNLIHQSVAFLLKDLQNKMPKVPG	179
E.lucius_Arg2_XP010877736	SLAIGSVEGHARQCPCDLCLIWVDAHADINTPLTSPSGNLIHQSVAFMLKELQNKMPPELPG	179
H.sapiens_Arg2_NP001163	SLAIGTISGHARHCPCDLCVVWVDAHADINTPLTSSGNLIHQPVSFLLRELQDKVPQLPG	180
	*****:..*:::*****:*****:*****: ***** *:*:*:*:*:*:*:*:*	
P.mesopotamicus_Arg2	FSWMKPFLSARDLVYIGX-----	163
C.carpio_Arg2_CAF02014	FSWMKPFLSARDLVYIGLRDVPGEHI IILKTLGIQYFSMRDIDRMGIQRVMEVTLDHLLA	239
D.rerio_Arg2_NP955905	FSWMKPFLSARDLVYIGLRDVPGEHVFLKTLGIQYFSMRDIDRMGIQRVMEVTLDHLLA	239
E.lucius_Arg2_XP010877736	FSWVKPFLSAKDLVYIGLRDVPGEYDILKELGIQCFMTRDIDRLGIQRVMEVTLDHLLS	239
H.sapiens_Arg2_NP001163	FSWIKPCISSASIVYIGLRDVPPEHFILKNYDIQYFSMRDIDRLGIQKVMERTFDLLIG	240
	:** :*: .:*	
P.mesopotamicus_Arg2	-----	163
C.carpio_Arg2_CAF02014	RKQRPIHLSFDIDAFDPSLAPATGTPVNGGLTYREGIYVTEEIHNTGLLSVMDVVEVNP	299
D.rerio_Arg2_NP955905	RKQRPIHLSFDIDAFDPSLAPATGTPVNGGLTYREGIYITEEIHNTGLLSVMDVVEVNP	299
E.lucius_Arg2_XP010877736	RKQRPIHLSFDIDAMDPSLAPATGTPVNGGLTYREGIWIITEEIHNTGLLSVMDLVEVNPV	299
H.sapiens_Arg2_NP001163	KRQRPIHLSFDIDAFDPTLAPATGTPVNGGLTYREGMYIAEEIHNTGLLSALDLVEVNPQ	300
P.mesopotamicus_Arg2	-----	163
C.carpio_Arg2_CAF02014	LGATPEAVEATTSLAVDVISSALGQTREGAHIAPFKIPEPKEDTELRL-----	347
D.rerio_Arg2_NP955905	LGAAPEAVEATTSLAVDIVASALGQTREGAHSVFPKITEPKEDTELRL-----	347
E.lucius_Arg2_XP010877736	LGASREAVEVTASLAVDIIASSLGQSRGGPIAQTQLKD-DTEQLRL-----	346
H.sapiens_Arg2_NP001163	LATSEEEAKTTANLAVDVIASSFGQTREGGHIVYDQLPTPSSPDESENQARVRI	354

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene Arg2 de *P. mesopotamicus* em comparação com as espécies de peixes *Cyprinus carpio*, *Danio rerio* e *Esox lucius*, e com a sequência de humanos. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à sequência de *P. mesopotamicus*, traços indicam a ocorrência de gaps. Sequências específicas da família Arginase são indicadas em cinza claro; histidina, ácidos aspártico e glicina envolvidos na ligação dos dois átomos de manganês são: Mn²⁺A (+), Mn²⁺B (Ψ) ou ambos Mn²⁺A e B (¶) e histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina (II) são indicadas. Número de acesso das sequências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

	Heme	
P.mesopotamicus_iNOS	-----AKEMFQ	6
C.carpio_iNOS_CAB60197	LEEVTKIEIATGSYRLTTKELEFGAKQAWRNAPRCIGRIQWANLQLFDARKCRTAEDMFQ	221
D.rerio_iNOS_XP009289930	VEEVAMEIDATGSYQLTTKELEFGAKQAWRNAPRCIGRIQWANLQLFDARKCQTAEDMFQ	172
O.mykiss_iNOS_NP001117831	LEEITMEIDSTGTYQLTVEELAFGARQAWRNAPRCIGRIQWSNLQLFDARKCKTTQEMFQ	168
H.sapiens_iNOS_AAB60366	VEAVTKIEIETTGTGYQLTGDDELIFATKQAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARSCSTAREMFE	225
	:..**:	
P.mesopotamicus_iNOS	FLCSHIKFATNGGNLRSATVFPQRTDGEHDFRVWNSQLIRYAGYQMEDGSVIGDPANVE	66
C.carpio_iNOS_CAB60197	MLCDHIQFATNGGNVRSATVFPQRTDQGHDFRVWNSQLIRYAGYKMTDGTIIGDPASVD	281
D.rerio_iNOS_XP009289930	MLCDHIQFATNGGNLRSATVFPQRADGQHDFRVWNSQLIRYAGYKIDGTLGDPASVD	232
O.mykiss_iNOS_NP001117831	FLCEHLQFATNGGNLRSATVFPFRKEDGHDHDFRVWNSQLLYAGYQMPDGSIQGDPSSVE	228
H.sapiens_iNOS_AAB60366	HICRHVRYSTNNGNIRSAITVFPQRS DGKHDHDFRVWNAQLIRYAGYQMPDGSIRGDPANVE	285
	:* *:::** **;***** * : *****;***:****:* ***: ***:..:	
P.mesopotamicus_iNOS	FTELCVQLGWTPKYGLFDVLPVVLQANGEDPELF-EIPPELILEVQMEHPQYEWFKDLNL	125
C.carpio_iNOS_CAB60197	FTEICIELGWTPRYQGFVLPVLPVQLQATEEDPSVFLKFPQHLILEVPMKHQQYKWFKDLNL	341
D.rerio_iNOS_XP009289930	FTEICIQLGWTPKYGLFDVLPVLPVQLQANGEDPQLF-EIPKDLILEVPMHPQYEWFKDLNL	291
O.mykiss_iNOS_NP001117831	FTKICIQLGWPKQYGLFDVLPVLPVQNGEDPDLY-EIPPHLILEVSMHPQHKKWFQDLGL	287
H.sapiens_iNOS_AAB60366	FTQLCIDLQGWPKYGRFDVLPVLPVQLQANGRDELF-EIPDLVLEVAMEHPKYEWFRLEL	344
	::***.*** **;***:***.. **.: : ** .*:*** *:* :***:*** *	
P.mesopotamicus_iNOS	RWYALPAVANMLEIGGLEFSACPFNGWYMGTEIGVRDFCDPQRYX-----	171
C.carpio_iNOS_CAB60197	RWFALPAVSNMLEIGGLEFPACPFNGWYMGTEIGVRDFCDTKRYNVLERVGRQMGLTQ	401
D.rerio_iNOS_XP009289930	RWYALPAVSNMLEIGGLEFPACPFNGWYMGTEIGVRNFCDTQRYNVLEHVGRQMSLETQ	351
O.mykiss_iNOS_NP001117831	KWYALPAVSNMMEIGGLEFPACPFNGWYMGTEIGVRDFCDYQRYNILEEVGRRMGLETH	347
H.sapiens_iNOS_AAB60366	KWYALPAVANMLEVGGLEFPGCPFNGWYMGTEIGVRDFCDVQRYNILEEVGRRMGLETH	404
	*:*****;***:***:***** .*****;***:*** **	

Figura 12. Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene iNOS de *P. mesopotamicus* em comparação com as espécies de peixes *Cyprinus carpio*, *Danio rerio* e *Oncorhynchus mykiss*, e com a seqüência de humanos. Resíduos idênticos (*) e similares (: ou .) são mostrados em relação à seqüência de *P. mesopotamicus*, traços indicam a ocorrência de *gaps*. Um dos sítios conservados de ligação de cofator da enzima está indicado em cinza. Número de acesso das seqüências utilizadas estão indicados na frente dos nomes.

5.3.3 Análise de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS em *P. mesopotamicus* após desafio com a bactéria *A. dhakensis*

Para determinar os níveis de expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS no fígado, baço e rim anterior de *P. mesopotamicus*, em resposta à infecção experimental por *A. dhakensis*, foram realizadas análises qPCR.

A expressão considerada basal, que foi avaliada na hora 0 pós-infecção tanto nos grupos tratado como controle, mostrou que o gene Arg1 é altamente expresso no fígado, diferindo significativamente dos níveis de expressão observados no rim ($p = 0,0001$). Em relação ao baço, Arg1 também foi significativamente mais expresso ($p < 0,0001$). Os níveis aparentemente maiores de expressão de Arg1 no rim em relação ao baço não foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey ($p = 0,0881$). O gene Arg2, por sua vez, apresentou os maiores níveis de expressão no rim, que foi estatisticamente maior em relação ao fígado ($p = 0,0009$) e ao baço ($p = 0,0002$). Como foi observado para Arg1, o baço mostrou os menores níveis de expressão de Arg2, porém, sem suporte estatístico em relação ao fígado ($p = 0,8260$). O gene iNOS apresentou os maiores níveis de expressão basal no rim, que diferiu significativamente dos níveis observados no baço ($p = 0,0050$), porém, foram iguais aos níveis observados no fígado ($p = 0,1389$). Os níveis de expressão de iNOS foram estatisticamente iguais no fígado e no baço ($p = 0,3540$) (Figura 13).

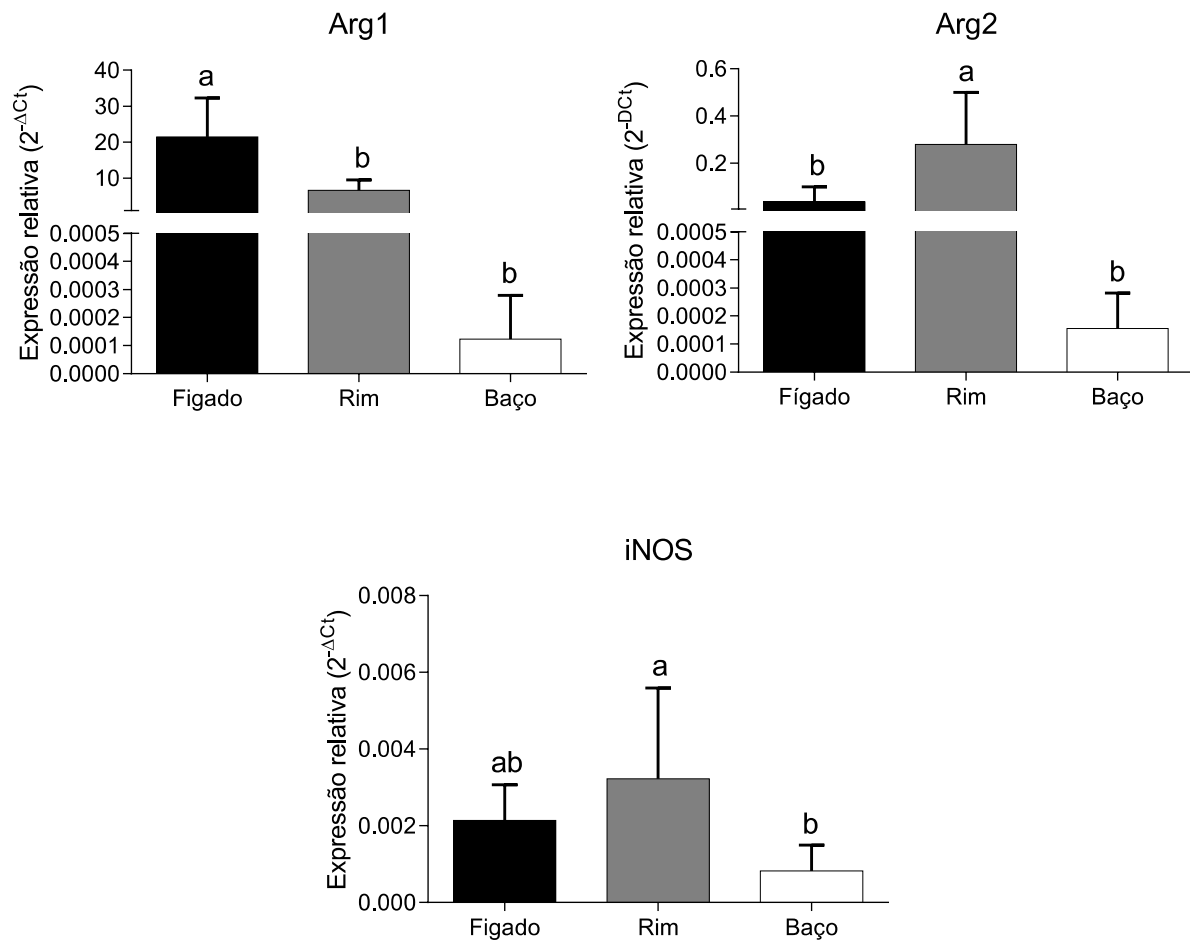


Figura 13. Expressão basal dos genes Arg1, Arg2 e iNOS observados por qPCR no fígado, rim e baço de *P. mesopotamicus* em relação à média geométrica dos controles endógenos 18S rRNA e β -actina. Os dados estão apresentados como média + desvio padrão. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Após a injeção intraperitoneal de $4,4 \times 10^4$ UFC/peixe, os níveis de mRNA dos genes das enzimas Arg1, Arg2 e iNOS foram estimados por qPCR e a expressão de cada um desses genes foi estimada em relação aos genes de referência endógenos 18S rRNA e β -actina.

No fígado, o único gene que apresentou variação significativa em resposta à infecção por *A. dhakensis* foi a Arg2, que mostrou uma diminuição nos níveis de expressão nos períodos 12 h ($p = 0,0278$) e 24 h ($p = 0,0199$) pós-infecção. Às 12 h, a expressão de Arg2 foi 5,73 vezes menor em relação ao controle, enquanto às 24 h essa diferença foi ainda mais significativa, com uma diferença de 6,37 vezes. Os genes Arg1 e iNOS, embora tenham apresentado variações nas médias entre o grupo infectado em relação ao controle, essas diferenças não foram estatisticamente significativas, uma vez que a ANOVA não apresentou variação significativa na interação Grupos/tempo ($p = 0,2858$) (Figura 14).

No rim, os níveis de expressão dos 3 genes em análise foram pouco alterados em resposta ao desafio com a bactéria *A. dhakensis*. O único gene que apresentou variação significativa no nível de expressão foi Arg1 ($p = 0,0017$), que teve sua expressão diminuída em 2,16 vezes no período de 24 h pós-infecção. O gene Arg2 mostrou níveis de expressão semelhantes entre o grupo infectado e controle nos 4 períodos observados, com exceção à 0 h, quando o grupo infectado aparentemente apresentou uma expressão maior. Porém, os grandes desvios observados fez com que essa diferença não fosse considerada estatisticamente significante. O mesmo foi observado para o gene iNOS, que demonstrou médias dos níveis de expressão maiores no grupo infectado em relação ao controle em todos os períodos, porém, os desvios observados também foram grandes e as diferenças foram consideradas não significativas (Figura 14).

O baço foi o órgão em que a infecção por *A. dhakensis* provocou as maiores alterações nos níveis de expressão dos genes Arg2 e iNOS. O gene Arg1, por sua vez, não apresentou variações significativas nos diferentes períodos pós-infecção. O gene Arg2 mostrou um aumento significativo nos níveis de expressão nos períodos de 24 h ($p = 0,0124$), com uma expressão 3,57 vezes maior que o controle, e 48 h ($p = 0,0241$), com uma expressão 3,04 vezes mais expresso que no grupo controle. O gene iNOS apresentou níveis de expressão significativamente maiores nos peixes infectados com *A. dhakensis* nos períodos de 12 h ($p < 0,0001$), com expressão 11,75 vezes maior, 24 h ($p = 0,0004$), com expressão 7,49 vezes maior e 48 h ($p = 0,0038$), com expressão 4,44 vezes maior (Figura 14).

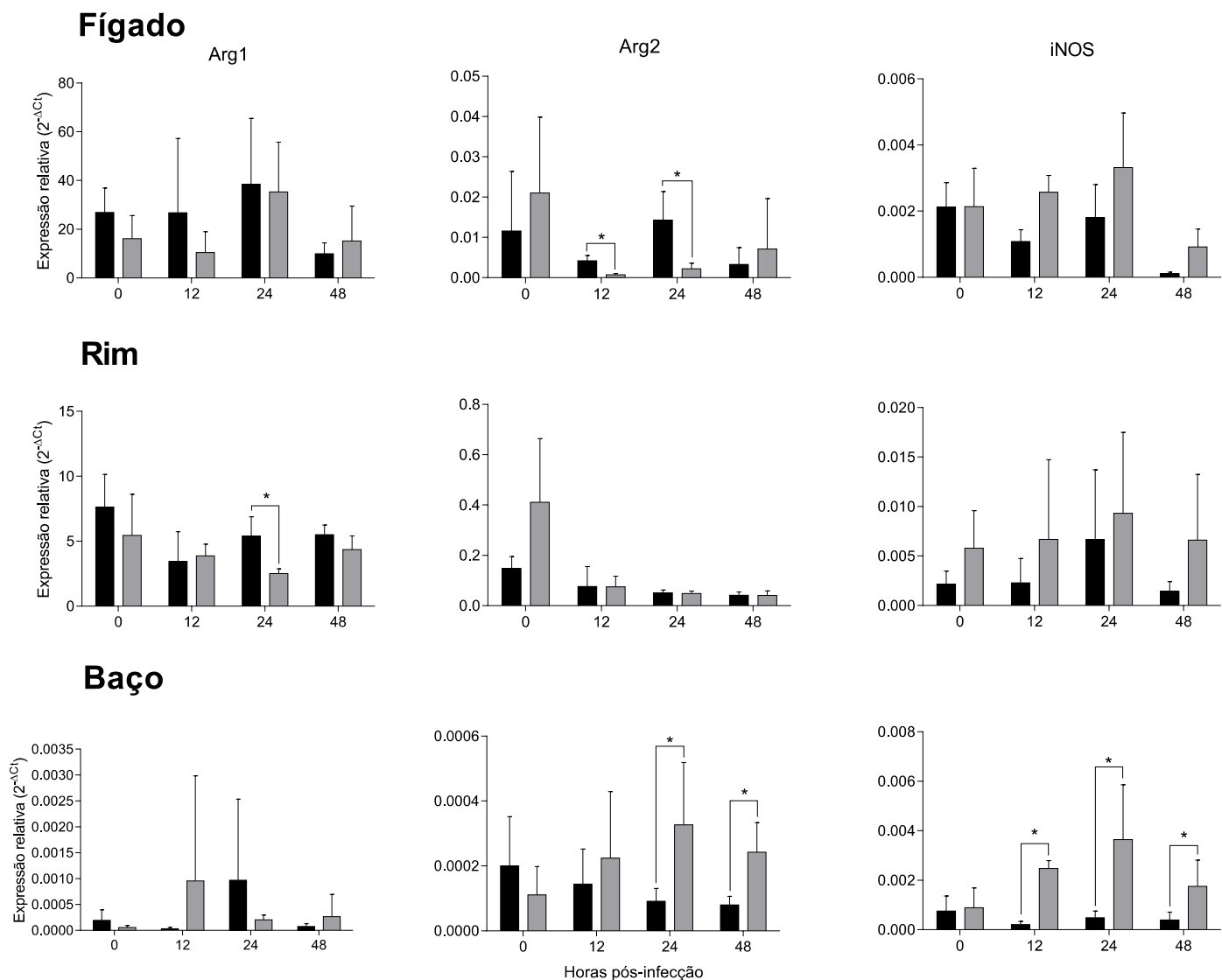


Figura 14. Expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de *P. mesopotamicus* infectados com *A. dhakensis* (▣) e controle (■) nos períodos de 0 h, 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção em relação à média geométrica dos controles endógenos 18S rRNA e β -actina. Os dados estão apresentados como média + desvio padrão. *Asteriscos* indicam diferença significativa de expressão em relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

Antes do início das análises de caracterização e expressão dos genes Arg1, Arg2 e iNOS do presente trabalho, os peixes utilizados nos experimentos foram caracterizados molecularmente para certificar que se tratavam de exemplares de *P. mesopotamicus* puros.

A identificação morfológica das espécies *P. mesopotamicus*, *P. brachypomus* e *C. macropomum* e dos seus híbridos na fase de alevinos é difícil de ser realizada, necessitando, portanto, de métodos moleculares. Neste experimento, a diferenciação entre as espécies foi realizada através da amplificação e sequenciamento do gene α -tropomiosina utilizando-se os métodos descritos por HASHIMOTO et al. (2011).

Embora BOECKLEN; HOWARD (1997) tenham afirmado que, para a correta identificação entre estoques puros e híbridos, é necessária a análise de mais de 70 marcadores nucleares, os resultados observados no presente trabalho sugerem que os métodos empregados foram eficientes para diferenciar as espécies pacu (*P. mesopotamicus*), tambaqui (*C. macropomum*) e pirapitinga (*P. brachypomus*), além do híbrido tambacu. As sequências de cada uma das espécies analisadas demonstrou características peculiares das quais foi possível diferenciar os exemplares de cada espécie. A espécie híbrida apresentou picos duplos nos eletroferogramas em posições em que havia diferença entre os puros homozigotos, sugerindo a ocorrência de hibridização.

Dessa forma, todos os peixes obtidos nessa piscicultura foram consideradas como sendo as espécies pela qual eram comercializadas. Esses resultados são diferentes do que foi observado por HASHIMOTO et al. (2014), que foi o trabalho que motivou a investigação da presença de híbridos entre os peixes utilizados para os experimentos do

presente trabalho, uma vez que os autores demonstraram que indivíduos híbridos eram tratados como espécies puras ou mesmo outro tipo de híbrido interespecíficos em 4 das 7 pisciculturas analisadas.

Para avaliar a possível ocorrência de macrófagos ativados pela via clássica (macrófagos M1) ou pela via alternativa (macrófagos M2) após a infecção da cepa sul-americana de *A. dhakensis* em *P. mesopotamicus*, foi realizada a caracterização das sequências parciais e análise dos níveis de expressão dos genes das enzimas características de macrófagos ativados por cada uma das vias. A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) está envolvida na produção de NO em macrófagos M1 e a enzima arginase, através das suas duas isoformas conhecidas (Arg1 e Arg2), é estimulada em macrófagos M2.

Como não existiam na literatura dados de sequência de DNA dos genes Arg1, Arg2 e iNOS para o peixe *P. mesopotamicus* ou mesmo para qualquer outro peixe da família Serrasalmidae, foram necessários esforços para a caracterização desses genes antes das análises de expressão. As análises de amplificação e sequenciamento produziram sequências parciais com 471 pb para Arg1, 488 pb para Arg2 e 513 pb para iNOS.

As sequências de nucleotídeos foram então traduzidas para sequências de aminoácidos. A comparação entre as sequências das duas isoformas da enzima arginase (Arg1 e Arg2) de *P. mesopotamicus* com as sequências de outras espécies de peixes e com a sequência de humanos, demonstrou a ocorrência de sítios específicos da família arginase, incluindo os resíduos de histidina, ácido aspártico, e glicina envolvidos na ligação dos dois íons de manganês, e os resíduos de histidina e ácido glutâmico envolvidos na ligação de L-arginina, que é o substrato da enzima (JOERINK et al., 2006). Ambas isoformas demonstraram grande similaridade com a sequência de

humanos (72,2% para Arg1 e 60,5% para Arg2), sugerindo também uma semelhança entre suas funções. Essa similaridade em relação às isoformas de humanos também foi observada para as arginases de carpa, com similaridades de 63% para ambas isoformas (JOERINK et al., 2006).

A enzima iNOS de *P. mesopotamicus*, através de sua sequência parcial de aminoácidos, também foi altamente similar com as sequências de outras espécies de peixes, e apresentou vários sítios conservados inclusive em relação à enzima de humanos (78,2% de aminoácidos conservados). Embora a sequência de aminoácidos obtida de *P. mesopotamicus* não tenha sido grande o suficiente para detectar sítios de ligação característicos da enzima, a comparação das sequências de outros peixes em relação à de humanos mostrou grande similaridade, possuindo todos os sítios de ligação para heme, tetrahydrobiopterina, calmodulina, flavina mononucleotídeo, flavina adenina dinucleotídeo, e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (SAEIJ et al., 2000), o que demonstra que essa enzima em peixes teleósteos tem um grande número de sítios conservados em relação a humanos, sugerindo também uma semelhança entre as suas funções.

Os dados de expressão basal demonstraram que o gene Arg1 é altamente expresso no fígado, seguido pelo rim, e com expressão extremamente baixa no baço, o que está de acordo com o que foi observado por outros autores para mamíferos e outras espécies de peixes teleósteos, que verificaram que a isoforma Arg1 é predominantemente encontrada no citosol de células hepáticas (ASH, 2004; SRIVASTAVA; RATHA, 2013). Essa isoforma está associada à produção de ureia pelo ciclo ornitina-ureia, para a excreção de compostos nitrogenados principalmente em animais ureotélicos (JOERINK et al., 2006). Peixes, entretanto, podem excretar amônia diretamente no ambiente aquático, eliminando a necessidade de um ciclo ornitina-ureia. Isso explicaria o que foi

observado por JOERINK et al. (2006) em seu estudo com carpa (*C. carpio L.*), onde observou baixos níveis de expressão de Arg1 no fígado, e uma maior expressão basal desse gene no rim médio. Porém, vários autores demonstraram que a ureia em animais não-ureotélicos possui funções fundamentais em diversos outros processos fisiológicos, como em algumas espécies de peixes que retém altas concentrações dessa substância para ser utilizada como reguladora de osmolaridade em casos de condições de aumento de salinidade do ambiente aquático ou em casos de desidratação (SAHA; RATHA, 1989;1994). A arginase hepática também está envolvida na síntese de ornitina, um precursor para a produção de poliaminas, glutamato e prolina, que possuem importante funções na proliferação celular e produção de colágeno para a cura de lesões (JENKINSON et al., 1996; MOMMSEN, 2001; WIEGERTJES; JOERINK, 2004; WIEGERTJES et al., 2016).

O gene da isoforma Arg2 apresentou os maiores níveis de expressão basal no rim de *P. mesopotamicus*, seguidos por fígado e baço. Embora o fígado tenha apresentado valores de expressão médios maiores para esse gene em relação ao baço, estatisticamente, os níveis de expressão basal foram considerados iguais pelo teste de Tukey ($p = 0,3540$). A diferença entre os níveis de expressão de Arg2 nos 3 órgãos analisados não foi tão grande quanto a observada para Arg1, que foi predominantemente hepática. Esses dados estão de acordo com o que foi relatado por outros autores, onde a isoforma Arg2 foi expressa em vários outros órgãos em carpa, humanos, camundongos e ratos (JOERINK et al., 2006; MORI; GOTOH, 2000; MORRIS; BHAMIDIPATI; KEPKA-LENHART, 1997).

O gene iNOS foi o gene que apresentou as menores variações de expressão basal nos diferentes órgãos, porém, a expressão desse gene no rim foi considerada maior em relação ao baço, mas não em relação ao fígado. A expressão nesse último, por sua vez,

não diferiu estatisticamente dos níveis observados no baço. Esses níveis de expressão estão consistentes com o que foi observado por FIERRO-CASTRO et al. (2013) em um estudo *in vitro*, onde linhagens celulares geradas a partir do baço de *O. mykiss* apresentaram níveis de expressão basal ligeiramente maiores dos observados em células derivadas de pronefros.

Após a infecção pela cepa sul-americana de *A. dhakensis*, os níveis de expressão de Arg1 foram menores em relação ao controle apenas no rim no período de 24 h pós-infecção, não havendo variação em outros períodos pós-infecção nos outros órgãos analisados. Diferentemente do que ocorre nos mamíferos, em peixes, a isoforma Arg1 está mais associada com funções excretoras pelo ciclo ornitina-ureia, e menos a funções hematopoiéticas e imunológicas (JENKINSON et al., 1996), o que sugere que essa pequena alteração observada esteja mais relacionada com algum outro processo biológico não avaliado, e não em resposta à infecção por *A. dhakensis*.

O rim anterior é um dos principais órgãos envolvidos na produção de resposta imunológica em peixes (PRESS; EVENSEN, 1999). Nesse órgão a expressão dos genes Arg2 e iNOS, que estão relacionados com o balanço entre macrófagos M1 e M2, não mostrou nenhuma alteração significativa em resposta à infecção por *A. dhakensis*. Embora as médias de expressão relativa do gene iNOS tenham sido maiores nos grupos infectados em relação aos grupos controle, essas pequenas alterações não foram consideradas estatisticamente relevantes, principalmente devido às grandes variações observadas dentro de cada grupo, evidenciadas pelos altos valores de desvio padrão. Esses resultados indicam que o rim anterior possui menor participação na resposta à infecção por *Aeromonas* em *P. mesopotamicus* quando comparado com os outros órgãos analisados.

No fígado, a expressão do gene Arg2 foi significativamente menor em relação ao controle nos períodos de 12h e 24h pós-infecção, e, como mencionado anteriormente, não houve nenhuma alteração da expressão de Arg1 nesse órgão. A expressão do gene iNOS apresentou médias de expressão constantemente maiores no grupo infectado em relação ao grupo controle a partir de 12 h pós-infecção, porém, sem confirmação estatística, uma vez que a análise de variância não mostrou interação grupo/tempo. A diminuição na expressão de Arg2 sugere que a população de macrófagos M2 no fígado diminuiu às 12h e 24 h pós-infecção com *A. dhakensis*. Acredita-se que o estado de ativação alternativa dos macrófagos seja o estado “padrão” dos macrófagos teciduais, que podem se alterar para macrófagos M1 em condições críticas que levariam a um fenótipo potencialmente danoso, como no caso de infecção por microorganismos patogênicos (MILLS; LEY, 2014).

No baço, que se mostrou o órgão mais envolvido na produção de respostas à infecção de *A. dhakensis* em *P. mesopotamicus*, foi observado um aumento na expressão do gene Arg2 em 24 h e 48 h pós-infecção, e o do gene iNOS em 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção. Um aumento na expressão do gene iNOS também foi observado por FIERRO-CASTRO et al. (2013) em um estudo com linhagens celulares derivadas do baço e de pronefros de truta arco-íris (*O. mykiss*) imunoestimuladas *in vitro*, e esses resultados se correlacionam com o aumento na produção de NO nessas mesmas linhagens celulares estimuladas com os mesmos imunoestimulantes observado por FIERRO-CASTRO et al. (2012).

Como o aumento nos níveis de iNOS ocorreu antes de Arg2, é provável que a ativação de macrófagos pela via alternativa ocorreu em resposta ao aumento do número de macrófagos ativados pela via clássica. Em infecções, acredita-se que um balanço no metabolismo da L-arginina é extremamente importante, já que, o aumento nas

concentrações de NO, que é um potente mediador de inflamação e possui atividade bactericida (KOPPANG et al., 2007) e, quando produzido em excesso, gera um ambiente citotóxico para as próprias células hospedeiras (RIEGER; BARREDA, 2011). Dessa forma, ocorre um aumento na expressão e atividade da arginase que favorece a replicação de fibroblastos e produção de colágeno, necessário para reparo dos tecidos e cura de lesões, além de restringir a disponibilidade da L-arginina necessária para a produção de NO pela enzima iNOS (BRONTE et al., 2003; VINCENDEAU et al., 2003; WIEGERTJES et al., 2016). Isso ficou evidenciado em estudos com macrófagos de mamíferos, onde, um aumento na expressão de Arg1 diminuiu a quantidade de arginina intracelular, restando menos substrato para a iNOS e, dessa forma, contrabalanceando o desenvolvimento de macrófagos M1. Esses resultados demonstram que o baço possui importante papel no balanço entre respostas pro- e anti-inflamatórias em resposta à infecção por bactérias em *P. mesopotamicus*.

Se o balanço entre macrófagos ativados pelas vias clássica e alternativa não é reestabelecido após o aumento de expressão do gene iNOS para produzir NO e combater a infecção, geralmente, esse desbalanço leva a reações imunopatológicas em consequência da aumento de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6, e das altas concentrações de NO (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MILLS et al., 2000).

A diferença observada no balanço entre a expressão de Arg2 e iNOS no fígado em relação ao baço pode ser decorrente do fato de que células de linhagens diferentes, obtidas a partir de tecidos diferentes e diferentemente estimulados, seja por lipopolissacarídeos (LPS), por bactérias, citocinas recombinantes como IFN- γ ou imunostimulantes como levamisol e ácido poliinosínico-policitidílico (Poli I:C), apresentam diferentes padrões de expressão para Arg2/iNOS (FIERRO-CASTRO et al.,

2013; RIEGER; BARREDA, 2011). Outra fator que pode ter contribuído para essa diferença é que, como peixes não possuem nódulos linfáticos e o baço é o órgão responsável por reter antígenos que possam ter alcançado a corrente sanguínea, a maior carga de bactérias nesse órgão desencadeou uma resposta mais aguda que nos outros órgãos analisados, gerando maior produção de NO. Como mencionando anteriormente, esse composto é citotóxico também para as células hospedeiras, e as grandes concentrações de NO geradas exigiu uma maior ativação de macrófagos M2 para limitar os danos nos próprios tecidos do hospedeiro (PRESS et al., 1994; RIEGER; BARREDA, 2011).

Os dados de expressão observados para as duas isoformas da enzima arginase de *P. mesopotamicus* observados no presente trabalho estão de acordo com o que foi relatado por JOERINK et al. (2006), que afirmaram que, diferentemente do que ocorre em mamíferos, em peixes, Arg2, e não Arg1, é diferencialmente regulada em infecções, e provavelmente é a isoforma mais ativa após a ativação alternativa de macrófagos.

O presente estudo fornece, pela primeira vez, a caracterização e dados de expressão de genes relacionados à ativação de macrófagos em *P. mesopotamicus* em resposta a uma cepa de *A. dhakensis*, uma das mais importantes bactérias patogênicas em peixes, que foi isolada pela primeira vez em águas sul-americanas. Macrófagos estão entre as primeiras linhas de defesa do organismo contra patógenos, fazendo deste trabalho uma ferramenta indispensável para estudos que visam combater infecções que podem comprometer as taxas de produção desse que é o segundo peixe nativo da América do Sul com maiores índices de produção na aquicultura brasileira (MPA, 2013).

6. CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas no presente estudo foi possível se obter as seguintes conclusões:

- A bactéria isolada do exemplar de *P. mesopotamicus* obtido do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMbio) tratava-se da espécie *A. dhakensis*, cuja ocorrência na América do Sul ainda não havia sido relatada;
- A cepa sul-americana de *A. dhakensis* isolada possui resistência aos antibióticos ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina e meropenem;
- A cepa isolada de *A. dhakensis* é altamente patogênica a *P. mesopotamicus*;
- As sequências parciais de aminoácidos dos genes Arg1, Arg2 e iNOS de *P. mesopotamicus* possuem grande similaridade às sequências de outros peixes e de humanos;
- Em *P. mesopotamicus*, o gene Arg1 possui maiores níveis de expressão basal no fígado, o gene Arg2 é mais expresso no rim, e o gene iNOS possui maiores níveis de expressão basal no rim e no fígado;
- O baço de *P. mesopotamicus* foi o órgão mais envolvido na resposta à infecção por *A. dhakensis*;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 2348-57, Jun 2003.

ADLER, A. et al. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 5, p. 1211-4, May 2014.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 5th. New York: Garland Science, 2008. 1601 ISBN 9780815341116 (hardcover).

AOKI, T. Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P. T. K. e BRUNO, D. W. (Ed.). **Fish Diseases and Disorders: CAB International**, v.3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 1999. cap. 11, p.427-454.

ARAVENA-ROMAN, M. et al. Distribution of 13 virulence genes among clinical and environmental *Aeromonas* spp. in Western Australia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 11, p. 1889-1895, Nov 2014.

ARDO, L. et al. Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 29, n. 1, p. 111-6, Jul 2010.

ARTS, J. A. et al. Functional analysis of carp interferon-gamma: evolutionary conservation of classical phagocyte activation. **Fish Shellfish Immunol**, v. 29, n. 5, p. 793-802, Nov 2010.

ASH, D. E. Structure and function of arginases. **J Nutr**, v. 134, n. 10 Suppl, p. 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S, Oct 2004.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens**. 4. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2007.

BARKSDALE, A. R. et al. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. **Surgery**, v. 135, n. 5, p. 527-35, May 2004.

BEAZ-HIDALGO, R. et al. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Syst Appl Microbiol**, v. 33, n. 3, p. 149-53, Apr 2010.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **J Fish Dis**, v. 36, n. 4, p. 371-88, Apr 2013.

BEAZ-HIDALGO, R.; MARTINEZ-MURCIA, A.; FIGUERAS, M. J. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martinez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. **Syst Appl Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 171-6, May 2013.

BOECKLEN, W. J.; HOWARD, D. J. Genetic analysis of hybrid zones: Numbers of markers and power of resolution. **Ecology**, v. 78, n. 8, p. 2611-2616, Dec 1997.

BRESSAN, F. F. et al. Improved production of genetically modified fetuses with homogeneous transgene expression after transgene integration site analysis and recloning in cattle. **Cell Reprogram**, v. 13, n. 1, p. 29-36, Feb 2011.

BRONTE, V. et al. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 302-306, Jun 2003.

CALCAGNOTTO, D. et al. Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. **Aquaculture**, v. 174, n. 1-2, p. 51-57, Apr 15 1999.

CASTELO-BRANCO DDE, S. et al. Virulence and antimicrobial susceptibility of clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. from northeastern Brazil. **Can J Microbiol**, v. 61, n. 8, p. 597-601, Aug 2015.

CHEN, P. L. et al. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 7, p. O428-34, Jul 2014.

DASH, P. et al. Four pro-inflammatory cytokines of rohu (*Labeo rohita*) during early developmental stages, their tissue distribution and expression by leucocytes upon in-vitro stimulation. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 913-922, Dec 2015.

ESTEVE, C.; ALCAIDE, E. Influence of diseases on the wild eel stock: The case of Albufera Lake. **Aquaculture**, v. 289, n. 1-2, p. 143-149, Apr 3 2009.

ESTEVE, C.; ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. **Microbes Environ**, v. 27, n. 4, p. 367-73, 2012.

ESTEVE, C.; ALCAIDE, E.; GIMENEZ, M. J. Multidrug-resistant (MDR) *Aeromonas* recovered from the metropolitan area of Valencia (Spain): diseases spectrum and

prevalence in the environment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 1, p. 137-45, Jan 2015.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2013**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 289

FIERRO-CASTRO, C. et al. Fish cell cultures as in vitro models of pro-inflammatory responses elicited by immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 2, p. 389-400, Aug 2012.

FIERRO-CASTRO, C. et al. Fish cell cultures as in vitro models of inflammatory responses elicited by immunostimulants. Expression of regulatory genes of the innate immune response. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 979-987, Sep 2013.

FIGUEIRA, V. et al. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. **Water Res**, v. 45, n. 17, p. 5599-611, Nov 1 2011.

FIGUERAS, M. J. et al. Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum*. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3742-6, Nov 2009.

FIGUERAS, M. J.; BEAZ-HIDALGO, R. *Aeromonas* infections in humans. In: GRAF, J. (Ed.). **Aeromonas**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2015. cap. 4, p.65-108.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170, n. 6, p. 2081-95, Dec 1 1989.

FRIESEN, V. L. et al. Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. **Mol Ecol**, v. 8, n. 12, p. 2147-9, Dec 1999.

GHENGHESH, K. S. et al. Genospecies and virulence factors of *Aeromonas* species in different sources in a North African country. **Libyan J Med**, v. 9, p. 25497, 2014.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies Nativas Para a Piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010. p.589-606.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S9-17, Nov 2007.

GRASSO, V. et al. Immunization of sea bream (*Sparus aurata*) juveniles against *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* by short bath: Effect on some pro-

inflammatory molecules and the Mx gene expression. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 292-296, Oct 2015.

GRAYFER, L.; HODGKINSON, J. W.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. **Dev Comp Immunol**, v. 43, n. 2, p. 223-42, Apr 2014.

GUTIERREZ DE PAULA, T. et al. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 169, p. 31-7, Mar 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HASHIMOTO, D. T. et al. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture**, v. 321, n. 1-2, p. 49-53, Nov 16 2011.

HASHIMOTO, D. T. et al. Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture. **Plos One**, v. 9, n. 3, Mar 3 2014.

HODGKINSON, J. W.; GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Biology of Bony Fish Macrophages. **Biology (Basel)**, v. 4, n. 4, p. 881-906, 2015.

HOLMES, P.; NICCOLLS, L. M.; SARTORY, D. P. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In: AUSTIN, B.;ALTWEGG, M., et al (Ed.). **The Genus Aeromonas**. New York: Wiley, 1996. p.127-150.

HUANG, D. et al. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Aeromonas Caviae* in a patient with cirrhosis. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 40, n. 3, p. 341-4, Mar 2015.

HUYS, G. et al. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (approved lists 1980). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, n. Pt 3, p. 705-12, May 2002.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. **Parasite Immunol**, v. 24, n. 3, p. 113-8, Mar 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 332-344, Aug 1998.

_____. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 1, p. 35-73, Jan 2010.

JANDA, J. M. et al. *Aeromonas* species in septicemia - laboratory characteristics and clinical observations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 77-83, Jul 1994.

JENEY, G. et al. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, n. 1, p. 1-15, Jul 15 1997.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 114, n. 1, p. 107-32, May 1996.

JOERINK, M.; SAVELKOUL, H. F. J.; WIEGERTJES, G. F. Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: Structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio L.*). **Molecular Immunology**, v. 43, n. 8, p. 1116-1128, Mar 2006.

JOSEPH, S. W. *Aeromonas* gastrointestinal disease: a case study in causation? In: AUSTIN, B.;ALTWEGG, M., et al (Ed.). **The Genus Aeromonas**. New York: Wiley, 1996. p.311-335.

KOPPANG, E. O. et al. Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 36, p. 3649-3655, 2007.

LIU, Y. et al. Multi-drug resistant gram-negative enteric bacteria isolated from flies at chengdu airport, China. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, n. 6, p. 988-996, Nov 2013.

LIU, Y. J. et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio L.*). **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 112-120, Mar 2015.

LOBOVA, T. I. et al. Antimicrobial resistance and plasmid profile of bacterial strains isolated from the Urbanized Eltsovka-1 river (Russia). **Microb Drug Resist**, v. 21, n. 4, p. 477-90, Aug 2015.

MAMMERI, H. et al. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4556-60, Nov 2010.

MARSDEN, M. J. et al. Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance to furunculosis. **Aquaculture**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, Oct 30 1996.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Order XII. Aeromonadales *ord. nov.* In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R., *et al* (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria**. 2nd. New York: Springer US, v.2, 2005. p.556-578.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009.

MARTINEZ-MURCIA, A. et al. Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. **Curr Microbiol**, v. 58, n. 1, p. 76-80, Jan 2009.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; ANTON, A. I.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 601-610, Apr 1999.

MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. **Syst Appl Microbiol**, v. 34, n. 3, p. 189-99, May 2011.

MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt 5, p. 1169-75, May 2008.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6166-73, Jun 15 2000.

MILLS, C. D.; LEY, K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. **J Innate Immun**, v. 6, n. 6, p. 716-26, 2014.

MIÑANA-GALBIS, D. et al. Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the cpn60 universal target. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, n. Pt 8, p. 1976-83, Aug 2009.

MOMMSEN, T. P. Paradigms of growth in fish. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 129, n. 2-3, p. 207-19, Jun 2001.

MORI, M.; GOTOH, T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 3, p. 715-9, Sep 7 2000.

MORINAGA, Y. et al. Identification error of *Aeromonas aquariorum*: a causative agent of septicemia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, n. 1, p. 106-9, May 2013.

MORRIS, S. M., JR.; BHAMIDIPATI, D.; KEPKA-LENHART, D. Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. **Gene**, v. 193, n. 2, p. 157-61, Jul 9 1997.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura: 59 p. 2013.

NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BELOSEVIC, M. Biochemical and functional characterisation of macrophage stimulating factors secreted by mitogen-induced goldfish kidney leucocytes. **Fish Shellfish Immunol**, v. 10, n. 2, p. 167-86, Feb 2000.

NGUYEN-CHI, M. et al. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. **Elife**, v. 4, p. e07288, 2015.

NOËL, W. et al. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 3, p. 126-33, Mar 2004.

OROZOVA, P. et al. Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 10, p. 865-871, Oct 2009.

PELLIZZARI, C. et al. High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. **Fish Shellfish Immunol**, v. 34, n. 5, p. 1269-78, May 2013.

PEREZ, L. et al. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Mediterranean Sea. **Dis Aquat Organ**, v. 116, n. 1, p. 69-74, Sep 17 2015.

PIETSCH, C. et al. Acute and subchronic effects on immune responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) after exposure to deoxynivalenol (DON) in feed. **Mycotoxin Research**, v. 31, n. 3, p. 151-164, Aug 2015.

PINHEIRO, M. H. P. et al. Cultivo do híbrido tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, com a pirapitinga, *Colossoma brachypomum* Cuvier, 1818, na densidade de 5000 peixes/Ha. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 22, p. 77-87, 1991.

PRESS, C. M.; DANNEVIG, B. H.; LANDSVERK, T. Immune and Enzyme-Histochemical Phenotypes of Lymphoid and Nonlymphoid Cells within the Spleen and

Head Kidney of Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, n. 2, p. 79-93, Mar 1994.

PRESS, C. M.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 309-318, May 1999.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 94, n. 3, p. 249-253, May 9 2011.

PUAH, S. M. et al. *Aeromonas aquariorum* clinical isolates: antimicrobial profiles, plasmids and genetic determinants. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 3, p. 281-4, Mar 2013.

RATH, M. et al. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Front Immunol**, v. 5, p. 532, 2014.

RAUTA, P. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. **Immunol Lett**, v. 148, p. 23-33, 2012.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am J Epidemiol**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RIEGER, A. M.; BARREDA, D. R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Dev Comp Immunol**, v. 35, n. 12, p. 1238-45, Dec 2011.

RIEGER, A. M.; HALL, B. E.; BARREDA, D. R. Macrophage activation differentially modulates particle binding, phagocytosis and downstream antimicrobial mechanisms. **Dev Comp Immunol**, v. 34, n. 11, p. 1144-59, Nov 2010.

RØED, K. H.; FEVOLDEN, S. E.; FJALESTAD, K. T. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. **Aquaculture**, v. 209, n. 1-4, p. 91-101, Jun 28 2002.

RØED, K. H. et al. Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 109, n. 3-4, p. 237-244, Feb 1 1993.

SAEIJ, J. P. et al. Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase. **Immunogenetics**, v. 51, n. 4-5, p. 339-46, Apr 2000.

SAHA, N.; RATHA, B. K. Comparative study of ureogenesis in freshwater, air-breathing teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, v. 252, n. 1, p. 1-8, 1989.

_____. Induction of ornithine-urea cycle in a freshwater teleost, *Heteropneustes fossilis*, exposed to high concentrations of ammonium chloride. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108B, n. 3, p. 315-325, 1994.

SARDER, M. R. et al. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. **Dev Comp Immunol**, v. 25, n. 1, p. 37-46, Jan 2001.

SEVERIN, V. I.; SOLIMAN, H.; EL-MATBOULI, M. Expression of immune-regulatory genes, arginase-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS), in two rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains following exposure to *Myxobolus cerebralis*. **Parasitol Res**, v. 106, n. 2, p. 325-34, Jan 2010.

SOLER, L. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 5, p. 1511-9, Sep 2004.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A. et al. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 654-662, Sep 2013.

SRIVASTAVA, S.; RATHA, B. K. Unusual hepatic mitochondrial arginase in an Indian air-breathing teleost, *Heteropneustes fossilis*: purification and characterization. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 164, n. 2, p. 133-41, Feb 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 12, p. 2725-9, Dec 2013.

VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 9-12, Jan 2003.

WIEGERTJES, G. F.; JOERINK, M. Macrophage polarization in the immune response to parasites. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2004.

WIEGERTJES, G. F. et al. Polarization of immune responses in fish: The 'macrophages first' point of view. **Mol Immunol**, v. 69, p. 146-56, Jan 2016.

WOO, P. T. K. **Fish Diseases and Disorders**. Second. UK: CAB International, 2006. 791

WU, C. J. et al. Clinical implications of species identification in monomicrobial *Aeromonas bacteremia*. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117821, 2015.

YAMAMOTO, S. et al. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. **Microbiology**, v. 146, p. 2385-2394, Oct 2000.

YANEZ, M. A. et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, n. Pt 3, p. 875-83, May 2003.

YANG, K. et al. IFN-gamma-activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages. **Fish Shellfish Immunol**, v. 35, n. 5, p. 1635-41, Nov 2013.

YEH, R. F.; LIM, L. P.; BURGE, C. B. Computational inference of homologous gene structures in the human genome. **Genome Res**, v. 11, n. 5, p. 803-16, May 2001.

YUCEL, N.; ERDOGAN, S. Virulence properties and characterization of aeromonads isolated from foods of animal origin and environmental sources. **J Food Prot**, v. 73, n. 5, p. 855-60, May 2010.

ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.1.391.74.9

Projeto: Taxonomia, Morfologia, Biologia e Patogenia de Parasitas e bactérias que infectam peixes capturados em pisciculturas e rios brasileiros.


Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Recomendação do Comitê de Ética:

- Aprovação.
- Não aprovado.
- Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.
- Retirado de pauta.

Pirassununga, 28 de maio de 2014.

Notifique-se o interessado.


Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins - Presidente do CEP/FZEA

Via do Parecer retirada pelo interessado:

Nome/Assinatura: _____

Data: