


Investigação de ilhas de resistência em genomas completos de *Brucella abortus*

 <https://doi.org/10.56238/sevned2024.026-033>

Antonio Santiago de Sousa Neto

Graduando de Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade Federal Rural da Amazonia (UFRA)
Campus Tomé-Açu

Fabricio Trindade Barroso

Graduando de Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade Federal Rural da Amazonia (UFRA)
Campus Tomé-Açu

Cleidianne Ferreira Dias

Graduanda de Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade Federal Rural da Amazonia (UFRA)
Campus Tomé-Açu

Adonney Allan de Oliveira Veras

Doutor em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal do Pará (UFPA) Campus Castanhal

Jorianne Thyeska Castro Alves

Doutora em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal Rural da Amazonia (UFRA)
Campus Tomé-Açu

Pablo Henrique Caracciolo Gomes de Sá

Doutor em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal Rural da Amazonia (UFRA)
Campus Tomé-Açu
E-mail: pablogomesdesa@gmail.com

RESUMO

A atual evolução das plataformas de sequenciamento elevou a quantidade de informações geradas e reduziu drasticamente os preços. O uso destas tecnologias viabilizou o desenvolvimento de diversas ciências ômicas. Deste modo, a realização de experimentos *in silico* através da bioinformática, fornece informações básicas para várias análises ômicas, como genômica, transcriptômica, metabolômica, entre outras.

Essas análises são importantes principalmente quando o alvo do estudo é um microrganismo de interesse biotecnológico, agropecuário ou ambiental, como é o caso da *Brucella abortus*, uma bactéria Gram negativa, imóvel com ausência de flagelos, não capsulada, não formadora de esporos, aeróbia, considerada um patógeno intracelular facultativo e cujo cultivo é considerado complexo.

Assim, o objetivo deste projeto é analisar os genomas completos de *Brucella abortus* disponíveis em banco de dados, através de abordagens de bioinformática, para caracterizar o perfil de resistência, evolução e mecanismos de virulência e patogenicidade.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, Bioinformática, Genômica, NGS, Procariotos.

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de genes de resistência a antibióticos dos microrganismos é denominado resistoma, proposto por Gerard D. Wright (Wright, 2007). O resistoma engloba os genes de resistência de bactérias patogênicas e não patogênicas, que incluem os genes produtores de antibióticos e os genes que codificam proteínas com modesta resistência ou com capacidade de ligação nas moléculas de antibiótico, inibindo sua ação (Caumo et al., 2010).

O descarte incorreto e o uso indiscriminado de antibióticos são fatores que têm contribuído com o aumento de bactérias resistentes a diversas classes de antibióticos. Antigamente, a resistência a antibióticos era restrita a ambientes hospitalares, mas estudos mais recentes têm demonstrado a presença dessas bactérias resistentes em diversos ambientes, tais como água e solo (Alves et al., 2020). A contaminação do ambiente por antibióticos pode ocorrer através de resíduos oriundos de unidades hospitalares, agricultura, pecuária e/ou deposição de lixo humano em lugares inapropriados. A presença desses antibióticos nesses ambientes atua selecionando naturalmente as bactérias resistentes, e estas por sua vez podem transmitir os genes de resistência através de plasmídeos, integrons e transposons, alterando o equilíbrio do ambiente microbiano (Andersson et al., 2016).

A transferência horizontal de genes tem um papel importante no desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos através da aquisição de genes de resistência, conferindo ao microrganismo que recebe o DNA exógeno novas capacidades metabólicas, permitindo sua sobrevivência e proliferação em ambientes com presença de antibiótico (Alonso et al., 2001).

Segundo Baba et al (2002), as ilhas genômicas (IGs) que apresentam resistência contra antibióticos são denominadas ilhas de resistência (REIs). De acordo com Yoon et al (2015), as REIs são uma classe de IGs ligadas à patogênese, conferindo resistência simultânea a múltiplos antibióticos e facilitando o surgimento de patógenos multirresistentes.

Assim, a investigação de genes de resistência em organismo de interesse biotecnológico e médico-veterinário são de extrema importância, como o microrganismo com a que causa brucelose em bovinos. *Brucella abortus* é uma bactéria gram-negativa que pode causar a brucelose em bovinos, levando ao aborto espontâneo em vacas grávidas, e infertilidade machos bovinos (Neta et al., 2010). A brucelose bovina é uma doença responsável por provocar grandes impactos econômicos no setor agropecuário de produção bovina, causando principalmente, abortos na reta final da gestação e nascimento de bezerros debilitados, podendo ocasionar no descarte precoce do animal, prejuízos estes que justificam esforços na busca de soluções efetivas de controle, o qual tem por estratégia de maior importância a vacinação (Souza, 2009).

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DE DADOS

Serão selecionados para a execução deste projeto os vinte e três (23) genomas completos de *Brucella abortus* (Tabela 1) e um de *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 depositados no banco de dados públicos National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabela 1. Cepas completas de *Brucella abortus* disponível no NCBI.

CEPAS	BioSample	BioProject	Identificação	SUBMISSÃO	DATA DE REGISTRO
CIIMS-NV-4	SAMN02604 294	PRJNA1 8999	NC_010742.1	Dr. GM Taori, Instituto de Ciências Médicas da Índia Central	22 de janeiro de 2018
A19	SAMN02604 220	PRJNA9 619	NC_006932.1	Universidade Agrícola da Mongólia Interior	8 de julho de 2018
NCTC 10505	SAMN02603 577	PRJNA7 4681	NC_016795.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
19BA	SAMN08295 219	PRJNA4 28582	NZ_CP02574 3.1	RARI e FSBI SCEEMP	18 de junho de 2018
clpP	SAMN09499 628	PRJNA4 78292	NZ_CP03075 1.1	Centro de Controle de Doenças Animais da China	1º de outubro de 2019
BAB841 6	SAMN02769 901	PRJNA2 44264	NZ_CP00770 0.1	Escola de Medicina da universidade Jiào Tong de Xangai	30 de junho de 2015
BD	SAMN09405 586	PRJNA4 75940	NZ_CP07776 5.1	China Agricultural University	22 de agosto de 2017
MC	SAMN12827 000	PRJNA5 73837	NZ_CP04433 8.1	China Agricultural University	22 de agosto de 2017
BJ1	SAMN02712 083	PRJNA2 43017	NZ_CP00877 4.1	China Institute of Veterinary Drug Control	23 de outubro de 2018
68	SAMN07508 059	PRJNA3 98311	NZ_CP02287 7.1	University of Alaska Fairbanks	17 de dezembro de 2020
BDW	SAMN07508 100	PRJNA3 98313	1:NZ_CP0228 79.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
BER	SAMN10238 131	PRJNA4 96294	1:NZ_CP0330 79.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
BFY	SAMN12837 785	PRJNA5 73988	1:NZ_CP0467 20.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
63 75	SAMN02769 911	PRJNA2 43877	1:NZ_CP0077 05.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
104M	SAMN02770 262	PRJNA2 44260	1:NZ_CP0077 09.1	Instituto de Biotecnologia de Pequim	22 de setembro de 2015
2308	SAMN02770 266	PRJNA2 43881	1:NZ_CP0077 65.1	Oak Ridge National Laboratory	28 de novembro de 2005
A13334	SAMN03108 762	PRJNA2 63969	1:NZ_CP0096 25.1	Macrogen	15 dezembro 2011

RB51	SAMN02767 917	PRJNA2 43872	1:NZ_CP0076 81.1	Departamento de Agricultura dos EUA	31 de março de 2020
S19	SAMN02767 934	PRJNA2 43875	1:NZ_CP0076 82.1	Instituto de Bioinformática da Virgínia	22 de maio de 2008
9-941	SAMN02786 918	PRJNA2 44261	1:NZ_CP0077 38.1	Universidade de Minnesota	5 de abril de 2005
86/8/59	SAMN02767 544	PRJNA2 43873	1:NZ_CP0076 63.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
870	SAMN17078 505	PRJNA6 85163	1:CP066175.1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014
C68	SAMEA3138 256	PRJNA1 6203	I:NC_007618. 1	Laboratório Nacional de Los Alamos	15 de agosto de 2014

Fonte: NCBI (2022).

2.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A realização da árvore filogenética será realizada a partir do gene *rpoB*, sendo que o alinhamento múltiplo será realizado pelo programa BioEdit (Alzohairy, 2011), através do programa ClustalW, e a construção da árvore pelo programa MEGAX (Kumar et al., 2018), usando o método Máxima Parcimônia com 1000 réplicas de bootstrap. Como grupo externo, o genoma utilizado será o da cepa *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 disponível no banco de dados do NCBI sob o número de acesso NC_000913.3.

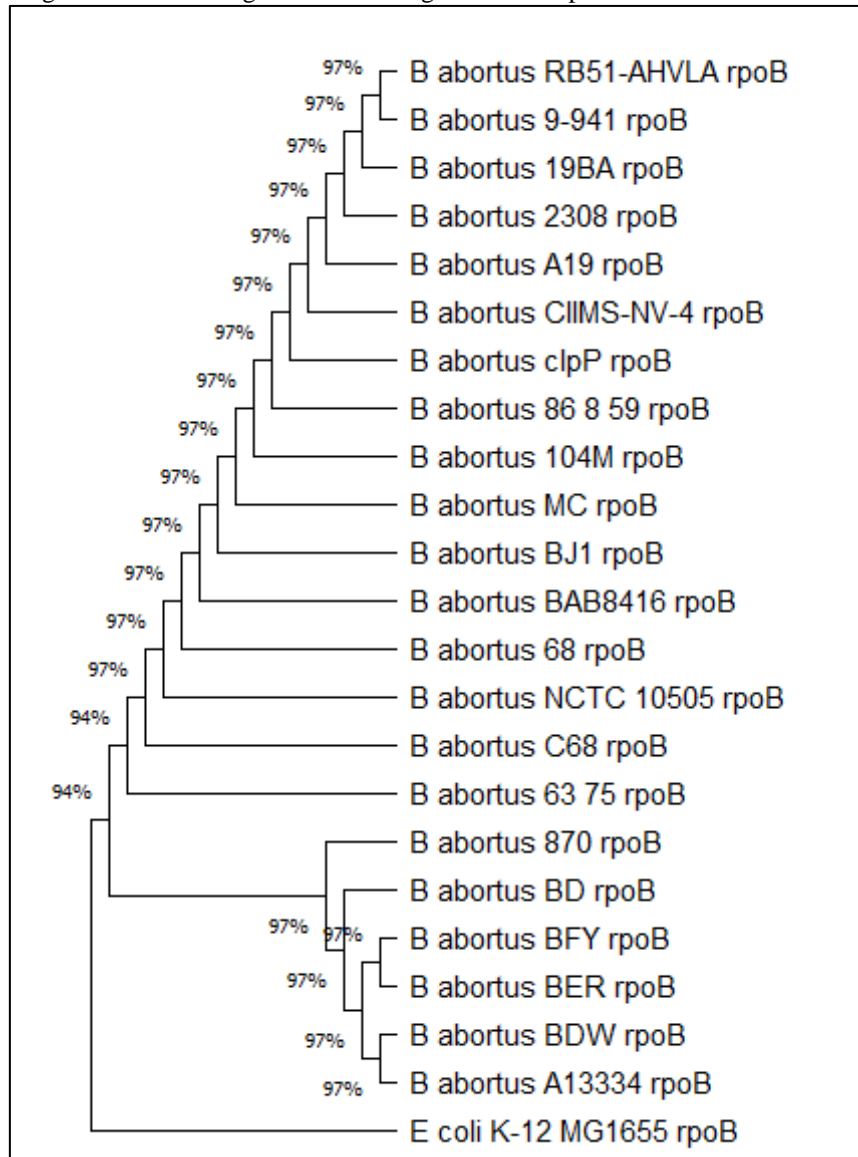
2.3 ILHAS DE RESISTÊNCIA

A realização da identificação das ilhas de resistência será executada pelo programa Gipsy (Soares et al., 2016), sendo esta ferramenta responsável pela predição de características genômicas compartilhadas entre uma espécie patogênica e outra não patogênica. Serão adotados os parâmetros padrão do programa para predição das IGs: desvio de conteúdo GC 1.5, desvio de uso de codón 0.95, genes de transposases 1E-04, busca por fatores específicos 1E-06, tRNA genes 1E-04 e ausência em outros organismos 1E-06.

3 RESULTADOS

A árvore filogenética foi realizada com 23 cepas de *B. abortus*, representada pela figura 1, na qual se pode observar os valores de bootstrap de no mínimo 94%, evidenciando uma alta taxa de proximidade entre as cepas.

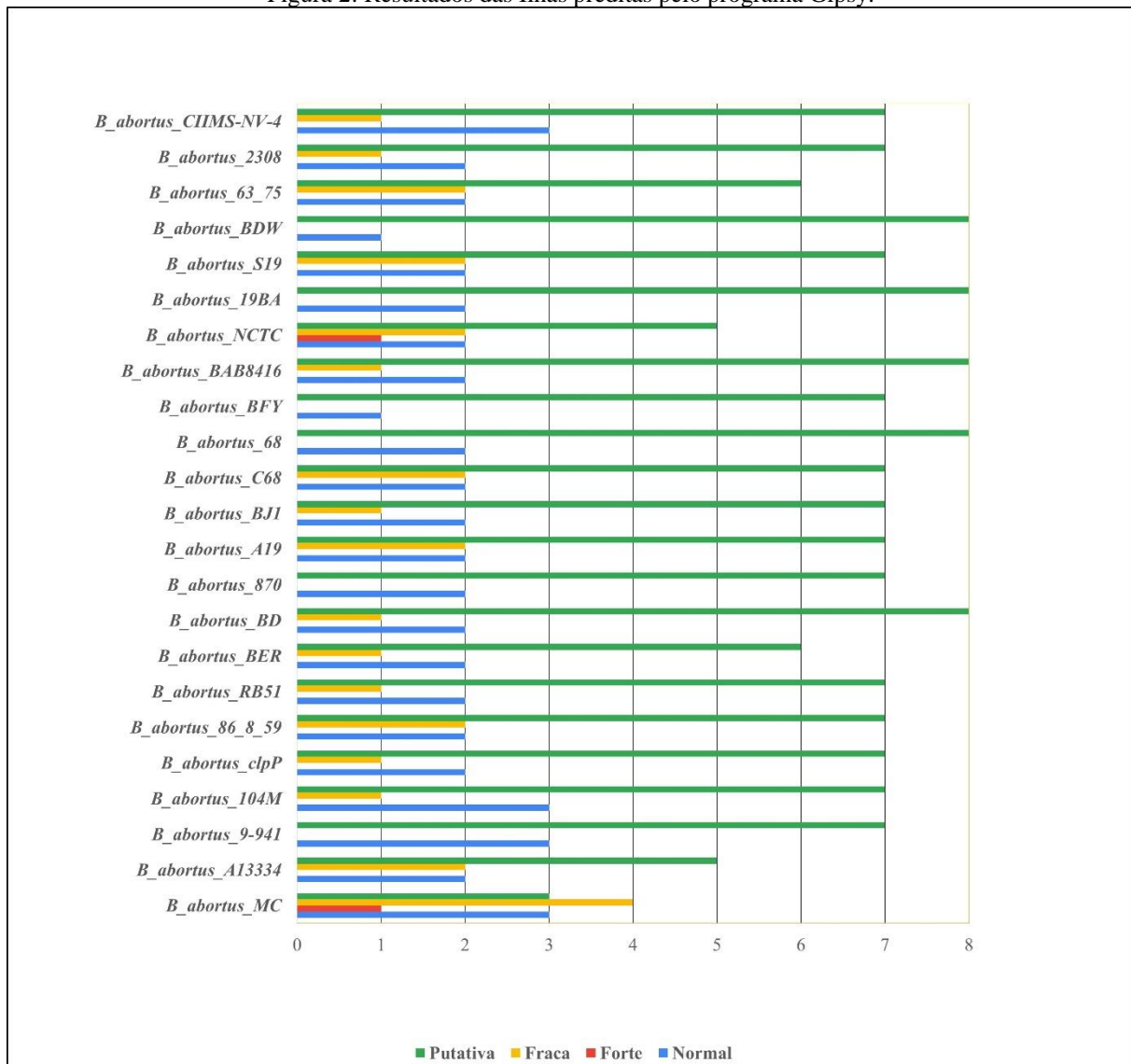
Figura 1: Árvore filogenética com os genomas completos de *Brucella abortus*.



Após a criação da árvore filogenética, foi realizada a identificação das ilhas de resistência de no programa Gipsy.

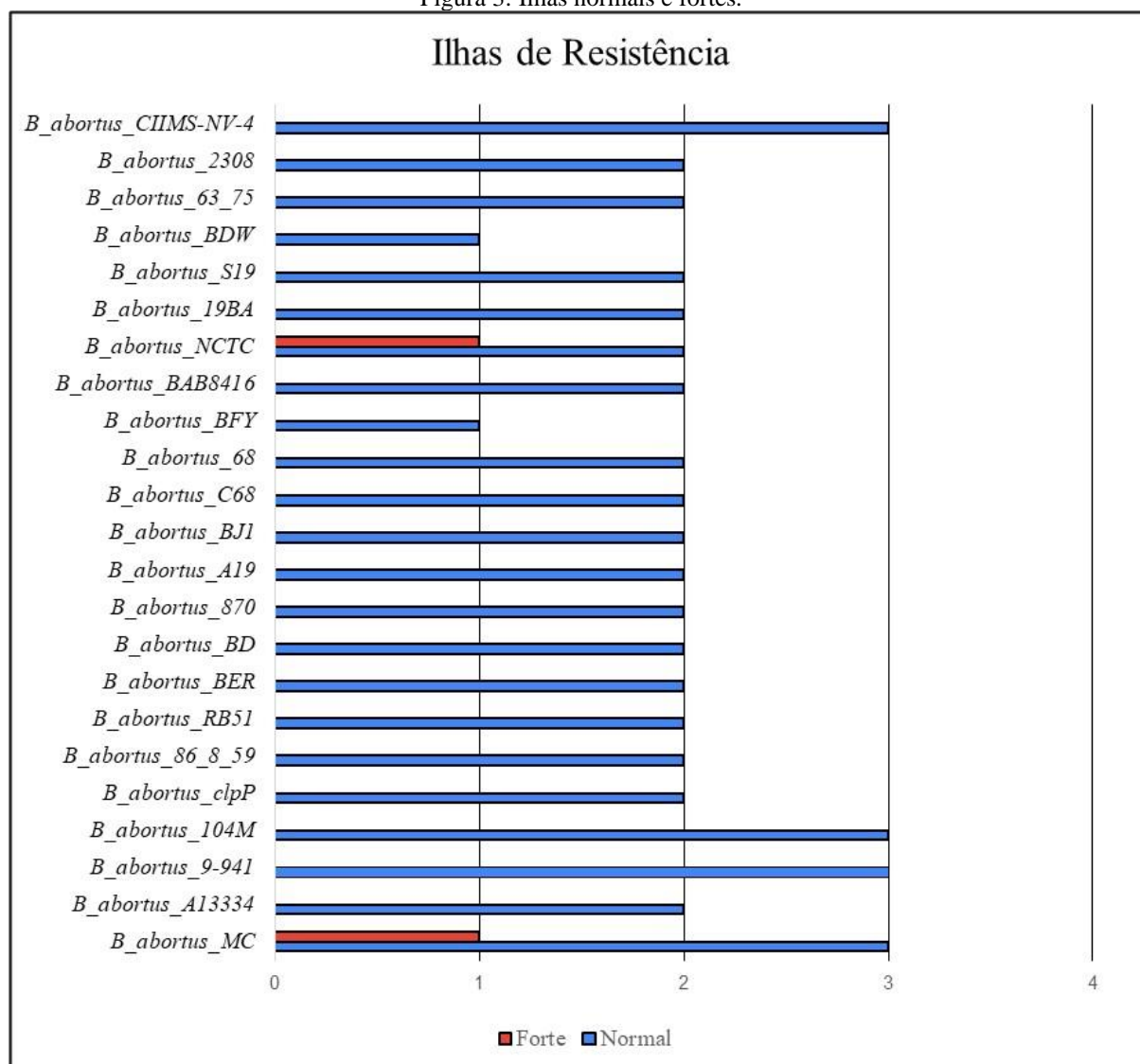
A figura 2 apresenta o número de REIs encontradas nas cepas de *B. abortus*, que são classificadas em putativa (156), fraca (27), forte (2) e normal (48). O número de REIs encontradas é de 233.

Figura 2: Resultados das Ilhas previstas pelo programa Gipsy.



Os resultados de interesses são normais e fortes apresentados na figura 3. Cepas com maiores números de ilhas identificadas *B. abortus MC* (4), *B. abortus 9-941* (3), *B. abortus 104M* (3), *B. abortus CIIMS-NV-4* (3).

Figura 3: Ilhas normais e fortes.



4 DISCUSSÃO

Segundo Moreira et al (2015), a árvore filogenética é uma representação gráfica, apresentando as relações evolutivas entre várias espécies, genes, proteínas ou quaisquer outros elementos que possam ter um ancestral comum.

O alto valor de similaridade encontrado entre as cepas na árvore filogenética (figura 1) já era esperado, pois, são cepas da mesma espécie e foi feita análise do *rpoB*. O gene *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase) é marcador molecular altamente conservado, também usado para identificar bactérias e para estudar suas relações evolutivas (Pulingam, 2022).

Através do método de bootstrap que consiste em um número associado a certo clado na árvore presente nas diferentes bases de dados (Efron, 1992). A árvore filogenética (figura 1) apresentou alta similaridade entre as cepas de *B. abortus*.

De acordo com Soares et al (2016), as ilhas genômicas recebem uma pontuação de predição como "Fraco", "Normal" ou "Forte" conforme as seguintes regras:

I - Forte, são regiões que apresentam concentrações muito altas do fator específico escolhido e todas as outras características quando comparadas a toda a sequência do genoma;

II - Forte, também para regiões que manifestam baixa e normal concentração de uma característica de assinatura genômica, alta concentração do outro e concentração muito alta do fator específico escolhido;

III - são classificadas como normais regiões que apresentam baixa concentração de uma característica de assinatura genômica e alta concentração do outro, com alta concentração do fator específico escolhido.

IV - Assim como a classificação de normal, também é utilizada para classificar regiões com normal a alta concentração do fator específico escolhido e, também, altas concentrações de 36 proteínas hipotéticas e desvio de assinatura genômica; e, (V) fraco de outra forma (Soares et al., 2016).

As predições das ilhas de interesse através do GIPSy, resultaram em um total de 50 REIs identificadas. Dentre os resultados apenas duas cepas, apresentaram REIs fortes, a cepa *B. abortus* NCTC e *B. abortus* MC o que indica que esses resultados têm uma alta probabilidade de serem IGEs verdadeiras, pois contêm genes conhecidos de resistência ou patogenicidade (Soares et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, descobriu-se que as 23 cepas que analisadas têm uma grande semelhança filogenética. Usando o GIPSy para fazer algumas análises e nota-se algumas mudanças interessantes. Por exemplo, o “desvio de G+C”, que é basicamente uma mudança na porcentagem de Guanina e Citosina no genoma. Também se nota um “desvio de uso de códons”, que se refere a quão frequentemente diferentes combinações de nucleotídeos, que formam um aminoácido na síntese de proteínas.

Portanto, os resultados mostram que as REIs podem estar relacionadas a características patogênicas que pode levar ao desenvolvimento de novas cepas resistentes a antibióticos ou que podem causar novas doenças. O estudo das ilhas genômicas é importante para entender a evolução das bactérias e o desenvolvimento da resistência a antibióticos e desenvolvimento de ilhas de resistência para desenvolver tratamentos mais eficientes contra bactérias com características patogênicas.



REFERÊNCIAS

- Alonso A, Sanchez P, and Martinez J L (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3(1), 1-9.
- Alves J, Dias L, Mateus J, Marques J, Graças D, Ramos R, Seldin L, Henriques I, Silva A and Folador A (2020). Resistome in Lake Bolonha, Brazilian Amazon: Identification of Genes Related to Resistance to Broad-Spectrum Antibiotics. *Front. Microbiol.* 11:67. doi: 10.3389/fmicb.2020.00067
- Alzohairy, A. (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*.
- Andersson D I, Hughes D, and Kubicek-Sutherland Uppsala J Z (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, 26, 43-57. Elsevier Ltd.
- Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto and K. Hiramatsu (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359:1819-1827.
- Caumo K, Duarte M, Cargnin S T, Ribeiro V B, Tasca T, and Macedo A J (2010). Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*, 11(16), 89–188.
- EFRON, Bradley (1992). Bootstrap methods: another look at the jackknife. In: *Breakthroughs in statistics: Methodology and distribution*. New York, NY: Springer New York.
- Kumar, S., Glen, S., Michael, L., Christina, K., & Koichiro, T. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and Evolution*.
- Moreira, LM & Varani, AM (2015). *Plasticidade e fluxo genômico*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Neta, A. V. M., de Souza, G. O., do Nascimento, M., & Monteiro, M A O (2010). Brucelose bovina: uma revisão. *Revista Eletrônica de Veterinária*, 11(12), 1-14.
- Pulingam, Thiruchelvi et al. (2022) Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Soares, Siomar C. et al. (2016) GIPSY: genomic island prediction software. *Journal of biotechnology*.
- Souza, Fabiane Gonçalves de (2009). Desenvolvimento e avaliação da virulência residual de uma cepa mutante de *Brucella abortus*. UFMS.
- Wright G D (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews. Microbiology*, 5(3), 175–86.
- Yoon SH, Park Y-K, Kim JF (2015) Paidb v2. 0: exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. *Nucleic Acids Res*.