



<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20080001>
www.higieneanimal.ufc.br

Artigo Científico

Análise Genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: dois Patógenos de Primeira Grandeza e de Genomas surpreendentemente complexos

(Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei Genome-wide Analysis: Two Bacterial Pathogens of Astonishingly Complex Genomes)

Diniz, M.C.¹, Farias, K. M.¹, Pacheco, A. C. L. P.¹, Viana, D. A.¹, Araújo-Filho, R., Lima, A. P. S.¹, Costa, R. B. e Oliveira, D. M.^{1*}

¹ Núcleo Tarcisio Pimenta de Pesquisa Genômica e Bioinformática – NUGEN

(<http://nugen.uece.br>), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará – Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000

Resumo: O gênero *Burkholderia* constitui mais de 40 espécies, incluindo genovares entre bactérias identificadas anteriormente como parte do complexo *B. cepacia* (Bcc), além de *B. mallei* (agente causal do mormo) e a *B. pseudomallei* (agente causal da melioidose ou pseudomormo). *B. mallei* e *B. pseudomallei* foram escolhidos como alvos deste trabalho exatamente pela incrível capacidade zoonótica (de certo modo, compartilhada na letalidade potencial para humanos e animais) e risco iminente à saúde pública em geral, assim como também por serem potenciais agentes bioterroristas, principalmente pela habilidade de infecção por aerossóis e a inexistência de vacinas efetivas. Ressalta-se, aqui, o caráter de re-emergência das zoonoses em geral, não só no Brasil, mas no mundo inteiro, em que aproximadamente 75% das doenças infecciosas humanas recém-emergentes são de origem animal; com a incrível porcentagem de cerca 60% de todos os patógenos humanos serem, em essência, zoonóticos. Apesar da relativa antiguidade das duas doenças, pouco se sabe sobre os detalhes e mecanismos de virulência e patogenicidade em mormo e melioidose. Neste trabalho foram usadas vários recursos e ferramentas de Bioinformática para investigar genes e produtos gênicos putativos em cromossomos e replicons seqüenciados dos genomas de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, numa abordagem patogenômica visando a identificação de genes representativos de fatores de

virulência associados com uma lesão-chave nas duas doenças, a formação de granulomas/piogranulomas. Granulomas são respostas localizadas de inflamação crônica capazes de reter os patógenos em seu interior, sendo, assim, sítios estratégicos da infecção. Os resultados *in silico* ajudaram a formar um painel preliminar contendo dezoito (18) ortólogos putativos, excelentes alvos para futuros *screenings* experimentais que venham a caracterizar precisamente suas funções na atividade granulomatogênica de *Burkholderia*.

Palavras-chave: *Burkholderia mallei*, mormo, *Burkholderia pseudomallei*, melioidose (pseudomormo), genoma, análise patogenômica, granulomas.

Abstract: The *Burkholderia* genus holds over 40 species of Gram-negative bacteria, including genomovars early identified as part of *B. cepacia* complex (Bcc), besides *B. mallei* (causative agent of equine glanders) and *B. pseudomallei* (causative agent of human melioidosis or pseudoglanders). Natural *B. mallei* and *B. pseudomallei* zoonotic infections have largely been eradicated/controlled and human infection is extremely rare, but renewed interest in these organisms parallels their classification as category B biothreat agents, the lack of any effective vaccine available for them and the serious risk of aerosol transmission, a great concern for public health surveillance. Both diseases are very ancient, but relatively little is known about details concerning virulence mechanisms in glanders and melioidosis. Here we apply bioinformatics resources and tools to investigate *B. mallei* and *B. pseudomallei* sequenced genomes, their putative genes (and coded proteins) in a pathogenomics approach aiming at the *in silico* identification of virulence genes potentially associated with a key-lesion of both diseases, the granuloma (or piogranuloma) formation. Granulomas are localized chronic inflammatory responses that are able to keep the pathogen inside of them and are, thus, critical sites of infection. Our results help to build a panel of eighteen (18) putative ortologs, which can be excellent targets for future experimental *screenings* that might lead to genetic characterizations of their functions in terms of granulomatous genesis within *Burkholderia* infections.

Keywords: *Burkholderia mallei*, glanders, *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, genome, pathogenomics analysis, granuloma.

Autor para correspondência. E. mail: * diana.magalhaes@uece.br
Recebido 10/02/2008; Aceito 28/03/2008

Introdução

O gênero *Burkholderia* constitui mais de 40 espécies (Tabela 1) e apenas em 1992 foi considerado formalmente um novo gênero (YABUUCHI et al., 1992), incluindo basicamente espécies anteriormente classificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, sete das quais foram transferidas para o novo gênero, incluindo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia caryophylli*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia pickettii* e *Burkholderia solanacearum* (YABUUCHI et al., 1992). A primeira *Burkholderia* (*B. cepacia*), originalmente descrita como *Pseudomonas*, foi um fitopatógeno identificado por BURKHOLDER (1950) como causadores da decomposição bacteriana de raízes de cebolas. Passados quase sessenta anos, o que se pode apreender sobre este gênero é que as espécies de *Burkholderia* são β -

proteobactérias bacilares, notáveis por sua versatilidade de metabolismos e de *habitats* (LESSIE et al., 1996; MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; CHAIN et al., 2006) e pela natureza multipartida de seus genomas, divididos em cromossomos (NIERMAN et al., 2004; HOLDEN et al., 2004). O estado multi-cromossômico representa um agravante de complexidade bacteriana, inclusive na reconhecida ação da *B. cenocepacia*, um importante patógeno oportunista humano que tem sido muito estudado por causar infecções pulmonares gravíssimas em pacientes com fibrose cística (*Burkholderia* Genome Database; BERNIER et al., 2003). Através de taxonomia, foram definidas especificamente nove espécies similares (genomovares¹), entre bactérias identificadas anteriormente como parte do complexo *B. cepacia* (*Burkholderia*

¹ Genomovar = termo que denota espécies genotipicamente distintas, porém fenotipicamente similares.

cepacia complex (Bcc)): *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, e *B. pyrrocinia* (representando genomovares I–IX, respectivamente).

A *B. mallei* é o agente causal do mormo (*glanders*, em inglês) (LOPEZ et al., 2003), uma doença primariamente de eqüídeos, transmissível ao homem, que aparece na forma cutânea ou sistêmica, enquanto *B. pseudomallei* é o agente causal da melioidose (ou pseudomormo), uma enfermidade que acomete humanos (WHITMORE, 1913) e ocasionalmente pode acometer mamíferos domésticos (DANCE, 1991). Estudos genômicos e epidemiológicos sugerem que *B. mallei* seja um clone que emergiu de *B. pseudomallei* e tenha uma predisposição mais restrita em relação a hospedeiros (GODOY et al., 2003). Ambos patógenos

apresentam características similares e de impressionantes versatilidade e resistência (JONES et al., 1996; GILLIGAN et al., 2003) e foram escolhidos como alvos deste trabalho exatamente pela incrível capacidade zoonótica (de certo modo, compartilhada) e risco iminente à saúde animal e humana, ou seja, à saúde pública em geral, assim como também por serem potenciais armas bioterroristas (CHAOWAGUL et al., 1989; ROTZ et al., 2002). Ressalta-se, aqui, o caráter de re-emergência das zoonoses, não só no Brasil, mas no mundo inteiro, em que aproximadamente 75% das doenças infecciosas humanas recém-emergentes são de origem animal; com a incrível porcentagem de cerca 60% de todos os patógenos humanos serem, em essência, zoonóticos (CDC report, 2007).

Tabela 1 - Listagem completa contendo as 44 espécies de *Burkholderia* spp. (e sub-gêneros) e respectivos registros/dados constantes do repositório mundial NCBI/GenBank/Entrez

Informações Gerais	Entrez/NCBI - Número de Entradas
---------------------------	---

<i>Burkholderia</i>	Ano	Local de Origem	Host	Nt	PG	Genes	GS	T	Prot	CDD	Es.	Pub Med
<i>B. ambifaria</i>	2001	Bélgica	H	2,738	4	13613	10	5	55.105	-	-	31
<i>B. cenocepacia</i>	2003	Bélgica	H, P	642	5	20845	11	6	53.317	5	1	135
<i>B. cepacia complex</i>	1993	Bélgica	H, A, P	5,002	13	56527	42	63	175.966	127	36	1,771
<i>B. mallei</i>	1885	Alemanha	H, A	2,741	10	22398	14	12	95.384	-	-	192
<i>B. multivorans</i>	1992	Bélgica	H	160	1	6375	8	6	24.920	-	-	108
<i>B. phymatum</i>	2002	Bélgica	LT	18	1	7901	4	2	15.001	3	1	9
<i>B. phytofirmans</i>	2005	Holanda	Cebola	17	1		3	2	14.488	9	2	2
<i>B. pseudomallei</i>	1913	Ásia, Austrália, regiões temperadas	H, A	31,342	20	26930	24	23	201.98	197	24	591
<i>B. thailandensis (B. ubonensis, 2000)</i>	1998	Tailândia	H, A	5800	4	5716	6	5	32.606	-	-	84
<i>B. vietnamiensis</i>	1978	Suécia	Arroz	103	1	7865	8	2	15.626			95
<i>B. xenovorans</i>	2004	Bélgica	A - Equino	26	2	9046	3	2	17.841	94	20	66
<i>B. unamae</i>	2004	México	P	16	-	-	-	2	7	-	-	
<i>B. caryophylli</i>	1942	EUA	P	22	-	-	-	1	14	-	-	14
<i>B. plantarii</i>	1987	Japão	P	66	-	-	-	1	61	-	-	15
<i>B. glumae</i>	1998	Japão	P	265	1		-	1	305	19	3	47
<i>B. andropogonis</i>	1954	EUA	P	48	-	-	-	1	33	-	-	19
<i>B. glathei</i>	1975	Alemanha	S	40	-	-	-	1	9	-	-	22
<i>B. graminis</i>	1998	França e Austrália	P	151	1	-	1	2	13.499	-	-	19
<i>B. phenazinium</i>	1973	Brasil	S	59	-	-	-	1	7	-	-	20
<i>B. caribensis</i>	1999	Ilha de Martini que	LT	10	-	-	-	1	4	-	-	13
<i>B. caledonica</i>	2001	Escócia	P	10	-	-	-	1	5	-	-	4
<i>B. hospita</i>	2002	Bélgica, Escócia Itália e Espanha.	P	11	-	-	-	1	3	-	-	1
<i>B. terricola</i>	2002	Bélgica, Escócia Itália e Espanha.	P	11	-	-	-	1	1	-	-	4
<i>B. sacchari</i>	2001	Brasil	P	5	-	-	-	1	11	-	-	8
<i>B. kururiensis</i>	2000	Japão	aquífero poluído	13	-	-	-	1	16	-	-	9
<i>B. tropicalis</i>	2001	América do	P	25	-	-	-	1	8	-	-	-

		Sul										
B. brasiliensis	2001	América do Sul	P	6	-	-	-	1	4	-	-	4
B. tuberum	2002	África do Sul e Guiana Francesa	P, LT	14	-	-	-	2	14	-	-	7
B. phymatum	2002	África do Sul e Guiana Francesa	P, LT	18	1	7901	4	2	15.001	3	1	9
B. dolosa	2003	Humanos	P, H	489	1	-	1	2	10.280	-	-	15
B. kirkii	2002	Bélgica	<i>Psychotria kirkii</i> (vegetal)	6	-	-	-	1	-	-	-	1
B. fungorum	2001	Bélgica	H, A, P, F	28	-	-	-	1	14	-	-	116
B. gladioli	1913	Bélgica	H, A, P	208	-	-	-	5	109	6	2	103
B. cocovenenans (Pseudomonas farinofermentans)	1960	Bélgica	H, A, P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. pyrrocinia	1965	Bélgica	H	44	-	-	-	1	33	-	-	34
B. anthina	1997	Inglaterra e EUA	H	27	-	-	-	1	22	-	-	13
B. tuberum	2002	Bélgica	LT	14	-	-	-	2	14	-	-	7
B. oklahomensis	2006	EUA	S	3.046	2	-	2	3	14.214	-	-	4
B. vandii	1994	Japão	Orq.	66	-	-	-	1	61	-	-	15
B. pickettii	1973	Japão	H, A	220	2	4	5	3	20.703	14	2	264
B. sartisoli	2008	Nova Zelândia	M	1	-	-	-	1	-	-	-	-
B. norimbergensis	2000	Bélgica	H, S	7	-	-	-	1	1	-	-	14
B. phenoliruptrix	2004	Bélgica	S	1	-	-	-	1	-	-	-	-
B. solanacearum	1896	Japão	P	3,357	2	5210	4	3	20,816	12	6	785

Host = hospedeiro natural (H = humano, A = animal, P = plantas, LT = legumes tropicais; C = cebola; M = milho; S = solos; Orq. = orquídea; F = fungos; ; Nt = número de seqüências de nucleotídeos; PG = número de projetos genomas já seqüenciados ou em seqüenciamento; Genes = número de seqüências de genes anotados; GS = número de seqüências genômicas depositadas (WGS, ESTs, etc); Taxo = taxonomia; Protein = número de seqüências de aminoácidos correspondentes a proteínas depositadas; CDD = número de domínios ou motivos conservados; Es = número de estruturas tridimensionais de proteínas já resolvidas; PubMed = número de citações de periódicos no PubMed; NCBI = *National Center for Biotechnology Information*; Entrez = portal de acesso a todos os bancos de dados do NCBI; GenBank = primeiro e mais conhecido banco de dados de nucleotídeos do NCBI.

Neste relato foram usadas vários recursos (bancos de dados e repositórios públicos) e ferramentas de Bioinformática (softwares e scripts de programação)

para investigar genes e produtos gênicos putativos em replicons² seqüenciados de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, incluindo todos cromossomos e elementos extra-cromossômicos, disponíveis (como NCBI, Sanger Center, Pathema, dentre outros). Os resultados apontam para a identificação *in silico* de alguns elementos potencialmente virulentos e estratégicos para o estabelecimento de uma lesão comuns às duas doenças, no caso a formação de granulomas/piogranulomas³. Em conjunto, os achados sugerem que um ponto diferencial concreto está nas ilhas genômicas: ausentes em *B. mallei* e presentes em *B. pseudomallei*, o que tem sido responsável pela hipótese de que essas ilhas genômicas possam tornar o

organismo *B. mallei* incapaz de habitar tantos nichos diferentes quanto o *pseudomallei* (Holden et al., 2004; Schell et al., 2008). Isto nos ajuda a compor uma hipótese adicional de que a expressão dos genes dispostos em tais ilhas, primariamente dedicados a funções de captação de ferro e adesão celular, poderiam regular os processos que envolvem a origem das atividades patogênicas mais drásticas em *B. pseudomallei*. Os resultados *in silico* deste trabalho ajudaram a formar um painel preliminar contendo dezoito (18) ortólogos putativos, excelentes alvos para futuros *screenings* experimentais que venham a caracterizar precisamente suas funções na atividade granulomatogênica de *Burkholderia*.

2. Antecedentes

Por considerar a importância estratégica das duas zoonoses no Brasil e no Estado do Ceará em particular, onde, ao contrário

² Um replicon consiste numa molécula ou região de DNA ou RNA que se replica a partir de uma única origem de replicação. Na maioria dos cromossomos procariotos, o replicon é o cromossomo circular inteiro, exceção feita a alguns genomas bacterianos multi-cromossômicos que podem portar vários replicons. Em eucariotos, há vários replicons por cromossomo.

³ Um granuloma constitui o protótipo de inflamação crônica produtiva, nodular, com células epitelíóides, macrófagos e outras células. A abscedação de um granuloma ou a transformação granulomatogênica de um abscesso pode ser denominada de piogranuloma.

da realidade mundial, mormo e melioidose ainda são doenças não apenas temíveis, mas ocorrentes (BRAGA & ALMEIDA, 2005; ROLIM et al., 2005; VIGIAGRO, MAPA, 2008), este trabalho de análise genômica em *Burkholderia* foi delineado. Objetivando explorar a disponibilidade atual de muitos dados e informações (tanto volumosos quanto complexos) a respeito do conteúdo e da plasticidade dos genomas já seqüenciados das duas espécies, além de extenso material sobre as mais de 40 espécies de *Burkholderia* (**Tabela 1**), em sua maioria fitopatogênicas, aproveitamos a oportunidade para apresentar uma perspectiva comparada sobre alguns fatores de virulência presentes nas duas espécies de *Burkholderia*. Tal abordagem patogenômica tenciona, sobretudo, oferecer uma visão contextualizada de genes e proteínas potencialmente envolvidas com dois mecanismos

patogênicos clássicos e comuns no mormo e na melioidose, a saber: a formação de granulomas (e/ou piogranulomas) e a persistência intracelular (JONES et al., 1996). Historicamente, o mormo é uma das doenças mais antigas que se conhece, fazendo parte da lista "B" do Escritório Internacional de Epizootias (OIE). A doença está incluída entre aquelas passíveis de aplicação das medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal Brasileiro (Art. 61 e 63 do Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934), sendo obrigatória a eutanásia dos animais doentes, já que o prognóstico é por demais reservado e o tratamento seria inconcebível pelo risco associado de disseminação da doença. A *B. mallei* foi responsável por altas morbidades e mortalidades em eqüídeos no mundo inteiro (WILSON & MILES, 1964) e por eventuais transmissões fatais ao homem;

embora, atualmente, o mormo seja extremamente raro em qualquer hospedeiro que se considere (relatório CDC, 2000), pois se encontra erradicado/controlado em muitos países, infelizmente este não é, ainda, o caso do Brasil, onde o mormo tem ocorrido de forma praticamente endêmica nos últimos quinze anos, principalmente, em vários Estados do Nordeste (MOTA et al., 2000; ADAGRO, 2008) e do Norte (VIGIAGRO, MAPA, 2008).

No que tange à melioidose, é uma doença infecciosa cuja transmissão para humanos e animais ocorre através do contato direto com a *B. pseudomallei* presente no ambiente via ingestão, inalação, ou por meio de solução de continuidade (feridas abertas e abrasões na pele). O bacilo móvel, não-esporulante e saprófito de águas, solos e mananciais em geral contaminados por atividades ocupacionais (principalmente agrícola, pecuária,

mineração) ou de lazer, pode sobreviver meses em ambientes ácidos ou pouco nutritivos, adversos e competitivos, reafirmando sua posição como patógeno intracelular facultativo. A produção de metabólitos secundários especializados e a adaptação a vias de catabolismo e sistemas de transporte e secreção (de proteínas do tipo II) bem complexos, além de elementos de virulência que incluem os flagelos (Pathema Portal, 2008) asseguram a *B. pseudomallei* um status privilegiado no rol dos microorganismos telúricos patogênicos.

2. Aspectos Microbiológicos e Genômicos

O nicho ecológico primordial da *B. mallei* parece ser as vias aéreas de eqüinos, enquanto a bactéria apresenta pouca capacidade de sobrevivência no ambiente (GILLIGAN et al., 2003), um dado frontalmente oposto à capacidade inata da *B. pseudomallei* de viver no solo e na

água, em fontes naturais no meio-ambiente (FUSHAN et al., 2005). Em comum, as duas espécies de *Burkholderia* têm o fato de serem bacilos Gram-negativos (**Figura 1**) e aeróbios obrigatórios (GILLIGAN et al., 2003) que são responsáveis pela etiologia de duas das mais importantes (ainda que raras) zoonoses que se conhece, tanto no âmbito final da Medicina Humana (a Melioidose) quanto da Medicina Veterinária (o Mormo). Os dois microorganismos podem se disseminar facilmente por aerossóis, tendo, assim, o potencial

Outros pontos em comum na maioria das espécies de *Burkholderia* são os genomas grandes (para procariotos) e repletos de replicons (genomas “*multireplicon*”), além da presença de múltiplas seqüências de inserção, conferindo alta plasticidade aos genomas e um dramático efeito sobre a estrutura cromossômica, o que talvez possa

virulento de causar graves doenças com alta taxa de mortalidade e numa intrínseca resistência a muitos antibióticos (Jones et al., 1996). Some-se a isto a inexistência de qualquer vacina efetiva disponível para ambas as enfermidades. Outrossim, ambas as espécies de *Burkholderia* compartilham também o temido posto de serem reconhecidos agentes bio-ameaçadores, uma vez que figuram na categoria B da lista “*Biothreat Agents, U.S. Centers for Disease Control and Prevention*” do governo dos EUA (CDC report, 2008).

explicar a grande versatilidade do gênero (Lessie et al., 1996; Chain et al., 2006). Quase trinta cepas de *Burkholderia* já foram (ou estão sendo atualmente) seqüenciadas (Joint Genome Institute (JGI)/Integrated Microbial Genomes (IMG); <http://img.jgi.doe.gov>; <http://www.sanger.ac.uk>). Dentre estas, os genomas completos das duas espécies,

B. pseudomallei K96243 (HOLDEN et al., 2004) e *B. mallei* ATCC23344 (NIERMAN et al., 2004) foram recentemente disponibilizados, servindo

de fonte de dados para muitas análises e inferências biológicas extraídas a partir das informações neles contidas, inclusive o presente trabalho.

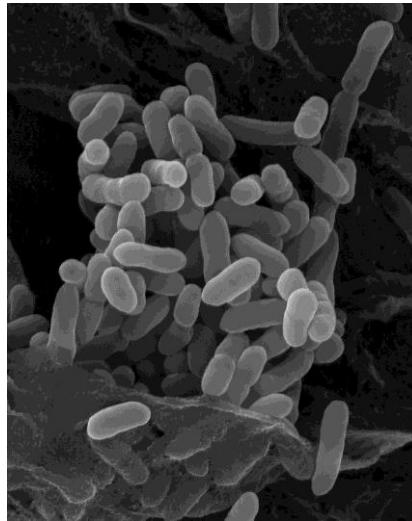


Figura 1 – Fotomicrografia eletrônica de varredura (SEM) de espécimes de *Burkholderia pseudomallei*, ilustrando aspectos estruturais (bacilares, contornos alongadamente arredondados) e de relativa individualidade intra-colônia. Magnitude do aumento: x2,600. Cortesia do autor (Dennis Kunkel, PhD). Direitos da imagem gentilmente cedidos por Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (<http://www.denniskunkel.com>)

3. Material e Métodos

Fontes – Bancos de Dados Biológicos e Ferramentas de Bioinformática

Foram usados conjuntos selecionados de dados disponíveis, genes (regiões codificadoras (CDS)) e proteínas individuais/clusters, operons, replicons e cromossomos de *Burkholderia spp.*,

obtidos a partir de bancos de dados (BDs) e repositórios públicos (NCBI, PDB, UniProt, GeneDB e Pathema) e/ou de trabalhos experimentais publicados em periódicos ou *websites* aqui referenciados. As buscas em BDs foram feitas usando os programas de alinhamento pareado de seqüências BLAST e suas variações,

inclusive o MEGABLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e de alinhamento múltiplo MUSCLE (EDGAR, 2004) para verificar similaridade e homologia entre as seqüências-alvo, identificar padrões através de perfis conservados e comportar as análises comparativas entre os dois genomas alinhados.

Análises In Silico

Todas as seqüências (CDS e proteínas) em formato FASTA (coletados a partir dos BDs e/ou fontes já referidos) foram alinhadas com BLAST e/ou MUSCLE, conforme detalhado (GOUVEIA et al., 2007); os alinhamentos forneceram as correlações hierárquicas e sucessivas entre cada par ou conjunto de seqüências-alvo. Todas as seqüências de *Burkholderia* foram usadas como *queries* (consultas) contra conjuntos de dados genômicos com PSI-BLAST (BLASTP2.2.10) (ALTSCHUL et al., 1997), seguidos de alinhamento múltiplo

de seqüências (MSA) com refinamento progressivo no MUSCLE (Edgar, 2004) sobre as entradas-alvo dos principais BDs-fontes testados contra várias coleções de motivos protéicos e famílias de proteínas incluindo SMART (Letunic et al., 2006) e Superfamily (GOUGH et al., 2001). Resultados de MSA foram usados para “treinar” os perfis de *datasets* com cadeias de Markov (HMM, hidden Markov models, Eddy, 1998) para detectar padrões de motivos dos clusters analisados. A anotação gênica foi feita com Artemis (RUTHERFORD et al., 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspectos como a presença/ausência de certas organelas (tais como flagelos e pilli), conjuntos de genes estratégicos, ilhas genômicas e de patogenicidade, além de características singulares de densidade e relevância de replicons são levados em conta na avaliação diferencial

das trajetórias de infectividade das duas bactérias com o objetivo de traçar um perfil patogenômico para cada uma delas que possa realmente balizar uma distinção formal entre as infecções oportunistas, servindo de eixo norteador para a análise. Embora se saiba que tanto fatores de virulência das linhagens como a imunossupressão no hospedeiro mamífero podem influenciar o estabelecimento e as conseqüências de ambas as infecções (QUINN et al., 2005), é sempre interessante tentar estabelecer elementos-chave, no caso genômicos, de conexão e de independência entre os sintomas e lesões comuns às duas zoonoses.

Análise Comparativa entre os Genomas de *Burkholderia mallei* e *B. pseudomallei*

Os genomas bacterianos (em sua grande maioria) são compostos por um único cromossomo. Tem-se visto, entretanto, que os genomas de várias famílias de procariotos, incluindo vários

É sabido que a *B. pseudomallei* apresenta, em sua estrutura, flagelos polares que a tornam móvel, diferente da *B. mallei* que, por não apresentar estruturas flagelares, não possui qualquer motilidade (GILLIGAN et al., 2003). Isto, porém, não parece diferir a capacidade das duas espécies em persistir no interior de células fagocíticas e macrofágicas, as quais, sendo especializadas na fagocitose e destruição microbica, deveriam coibir a tendência de formação de lesões nodulares/abscedativas e/ou erosivas, inclusive a formação de granulomas (ou piogranulomas) (HIRSH & ZEE, 2003; ROLIM et al., 2005).

patogênicos, contêm mais de um cromossomo (KOLSTO, 1999; EGAN et al., 2005), ou seja, são genomas bacterianos complexos, nos quais o cromossomo maior (principal) geralmente

possui a maioria dos genes essenciais, enquanto o(s) cromossomo(s) menor(es) (ou secundário(s)) possui(em) relativamente poucos genes essenciais (EGAN et al., 2005; LIVNY et al., 2007). Assim como todos os organismos vivos, as bactérias também precisam segregar ativamente seus cromossomos replicados antes da divisão celular para viabilizar,

nas células-filhas, a integridade do genoma por várias gerações, embora os processos de segregação cromossômica em procariotos com mais de um cromossomo ainda permaneçam pouco compreendidos (DUBARRY et al., 2006; THANBICHLER et al., 2006; YAMAICHI et al., 2007).

Tabela 2 – Quadro comparativo de aspectos básicos entre os genomas de duas espécies de *Burkholderia*, relacionando tamanho de genomas e de cromossomos e densidade gênica.

Características	<i>Burkolderia mallei</i>	<i>Burkolderia pseudomallei</i>
Genoma	5.8 Mb	7.2 Mb
Cromossomo 1	3,510,148 pb	4,074,542 pb
Cromossomo 2	2,325,379 pb	3,173,005 pb
Conteúdo G+C %	68	67,6
Número de RNAt	47	61
Seqüências codificantes	5,535	5,855
Regiões SSR	7,084	8,560
Genes	5,229	6,323

Como as espécies do gênero *Burkholderia* são extremamente versáteis em sua fisiologia e sobrevivência (Mahenthalingam et al., 2005), não seria exagero atribuir parte dessa versatilidade

aos seus grandes e complexos genomas, já que elas tiveram a adição de material genético novo ao genoma básico necessário para a vida-livre. Enquanto o DNA exógeno (ou importado) poderia,

em tese, ser integrado ao cromossomo, parece claro que as *Burkholderia spp.* optaram por mantê-lo em replicons separados (DUBARRY et al., 2006). Tal “escolha” deveria refinar o mecanismo que assegura a segregação ordenada, especialmente porque três dos replicons são grandes o suficiente para se qualificar como cromossomos. Nesta análise, procuramos avaliar o quanto cada replicon de *B. mallei* e de *B. pseudomallei* alberga *loci* de genes essenciais (e/ou envolvidos com a virulência) e o quanto cada cromossomo de *B. mallei* e *B. pseudomallei* difere em termos de replicons e de conteúdo de genes potencialmente associados com a virulência. Conforme pode ser visto na **Figura 2**, que representa uma simplificação comparativa direta entre as categorias funcionais básicas de genes anotados das duas espécies (HOLDEN et al., e NIERMAN et al., ambos 2004), há

uma marcante predominância de genes da categoria dos elementos funcionais extra-cromossômicos e móveis no genoma de *B. mallei* (279 genes de um total de 5229, ou 5.33%) quando comparando-se ao genoma de *B. pseudomallei* (131 genes de um total de 6323, ou 2.07%). Esta diferença é muito significativa, se levados em conta todos os pressupostos de que elementos funcionais extra-cromossômicos e móveis podem representar como geradores de diversidade funcional. Deve-se mencionar que a transferência horizontal de genes (HGT) é um mecanismo chave na evolução bacteriana, enquanto a aquisição e retenção de blocos de DNA, codificadores de centenas de genes, representa um mecanismo rápido para a evolução. A HGT pode ter um impacto mais imediato e significativo sobre o fenótipo do organismo quando comparado com processos mais lentos,

tais como acúmulo de mutações no interior de genes individuais e a subsequente seleção por fenótipos vantajosos. Esses segmentos de DNA que não co-evoluem com o cerne do genoma

(geralmente referidos como ilhas genômicas), são adquiridas por HGT (Hacker & Carniel, 2001).

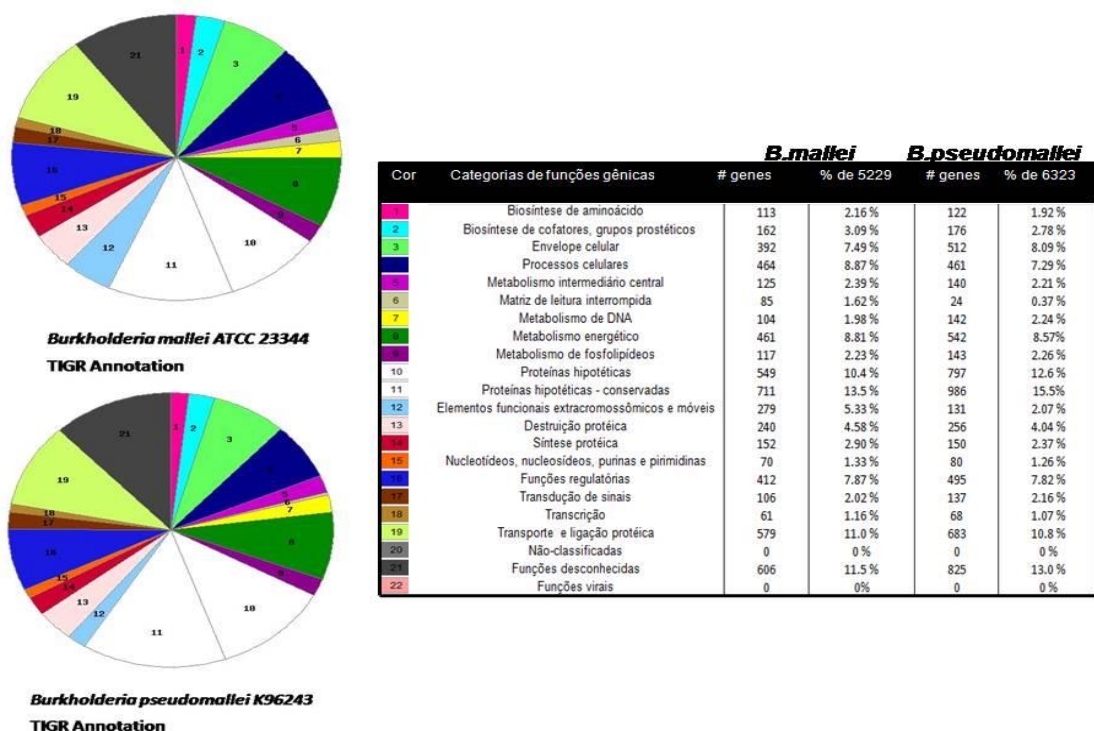


Figura 2 – Categoria funcional de genes atribuída por métodos de Bioinformática (anotação gênica e caracterização preditiva feita por análises comparativas *in silico*). Adaptação modificada a partir de dados publicados (Fontes: Holden et al. (2004), Nierman et al. (2004), Chain et al. (2006), THONGBOONKERD et al. (2007) e SITTHIDET et al. (2008).

Nos genomas bacterianos, as ilhas genômicas se caracterizam por incluir um típico conteúdo G+C, a proximidade a genes de RNA (tRNA), e a presença de determinantes genéticos responsáveis pela

mobilização delas e a sua manutenção estável no genoma. Uma maneira de classificar as ilhas genômicas se baseia nas funções que elas codificam, tais como atividades metabólicas adicionais,

resistência a antibióticos ou propriedades do tipo simbiose ou patogênese (DOBRINDT et al., 2004). Ilhas genômicas que codificam determinantes de virulência (as chamadas ilhas de patogenicidade) já foram descritas numa infinidade de patógenos e, em muitas instâncias, foram implicadas como os responsáveis genéticos por traços virulentos eventuais em espécies não-patogênicas. Por este motivo, elas representam bons elementos, ao mesmo tempo de conexão e de divergência, no estudo patogenômico de *Burkholderia spp.*, como ora descrito aqui. Nesse sentido, um aspecto comum e relevante das ilhas de patogenicidade é a presença de genes de mobilidade presumivelmente envolvidos na mobilização das ilhas junto ao cromossomo recipiente. Embora a aquisição de ilhas de patogenicidade possa prover uma vantagem seletiva ao aumentar a virulência de certas linhagens

bacterianas, pode-se facilmente atribuir um papel também significativo ao controle dessa aquisição, ou seja, em certos ambientes (como os solos úmidos e ácidos favoráveis a *B. pseudomallei*) talvez a sobrevivência de linhagens de *Burkholderia* esteja associada a presença (maior ou menor) das ilhas genômicas.

B. pseudomallei. O genoma da cepa K96243 é composto por dois cromossomos: um de 4,07Mb e outro de 3,17Mb, mostrando uma importante participação funcional entre eles; enquanto o primeiro cromossomo (cr1) se encarrega de codificar proteínas correspondentes a várias funções do metabolismo celular, o segundo (cr2) é responsável por genes com funções relacionadas a sobrevivência em diferentes nichos que a *B. pseudomallei* pode habitar. O cr1 revela o distinto particionamento de funções básicas e acessórias (**Tabela 3**), e contém uma alta

proporção de regiões codificadoras (CDs) envolvidas nas funções básicas, tais como biossíntese de macromoléculas, metabolismo de aminoácidos, síntese de cofatores e carreadores, biossíntese de proteínas e nucleotídeos, quimiotaxia e mobilidade. O cr2, em contraste, contém uma grande proporção de CDs de funções acessórias: adaptação para condições atípicas, proteção osmótica e aquisição de

metais, metabolismo secundário, regulação, e DNA lateralmente adquirido, além de possuir uma grande quantidade de proteínas não identificadas parcialmente ou totalmente nos bancos de dados. A comparação entre os dois cromossomos revela pouca similaridade, com exceção as regiões dos grupos de rRNA (Holden et al., 2004).

Tabela 3 - Distribuição de CDs em torno de diferentes classes funcionais nos dois cromossomos (cr1 e cr2) de *B. pseudomallei*

Papel - Sequências Codificantes	Cr1(% de CDs)	Cr2(% de Cds)
Proteínas Hipotéticas	8	10,4
Proteínas Hipotéticas Conservadas	12,1	13,6
Quimiotaxia e Motilidade	1,7	0,5
Replicação Cromossômica	0,2	0,1
Chaperonas	0,7	0,3
Reação de Proteção	1	1,5
Proteínas Transporte/Ligação	7,2	7,5
Adaptação	0,5	0,7
Degradação Macromolecular	0,8	0,6
Biossíntese/Modificação Macromolecular	6,4	2,1
Biossíntese de aminoácidos	2,5	0,8
Biossíntese de Cofatores/Carreadores	3	1
Metabolismo Central/Intermediário	3,6	3,3
Degradação de pequenas moléculas	3,7	3,6
Metabolismo energético – Carbono	3,3	3
Biossíntese de Ácidos Gordurosos	0,8	0,7
Biossíntese de Nucleotídeos	0,9	0,2
Metabolismo Secundário	0,3	2
Envelope Celular	19,5	18,4
Constituintes Ribossômicos	1,7	0,1
Elementos Adquiridos lateralmente	3,5	5
RNA polimerase	0,3	0,2
Reguladores	3,7	6,4
Papel Desconhecido	1	0,9

Fonte: Adaptado a partir de Holden et al. (2004).

Ortólogos foram encontrados em ambos cromossomos com uma percentagem variável de CDs de 57% no cr1 e 25% no cr2. Em comparações mais distantes, foram constatados ortólogos em bactérias do gênero *Pseudomonas* (*P. aruginosa*, *P. putida*, *P. syringae*) e em *Xanthomonas campestris*; essas espécies possuem apenas um cromossomo (STOVER et al., 2000; Nelson et al., 2002; Buell et al., 2003; Silva et al., 2002). Proteínas ortólogas foram encontradas em outras espécies, membros da família *Burkholderiaceae*, como a *Ralstonia solanocearum* (SALANOUBAT et al., 2002). Com 7.3Mb, o genoma de *B. pseudomallei* é grande, se comparado com um genoma procariótico típico. A aquisição horizontal

B. mallei, o agente etiológico do mormo, quando comparado a *B. pseudomallei*, mostra uma distribuição e gama de hospedeiros bem mais restritas.

de DNA parece ser intrínseca a evolução deste organismo. Muitas regiões dentro dos dois cromossomos apresentam algumas das características de ilhas genômicas mencionadas anteriormente e listadas na **Tabela 4**. Acredita-se que essas ilhas genômicas tenham sido adquiridas através de transferência lateral bastante recente, como anomalias na porcentagem de conteúdo G+C ou padrão de frequência dinucleotídica do DNA nessas regiões (HACKER & CARNIEL, 2001; DOBRINDT et al., 2004). Além disso, essas regiões frequentemente contém CDs com similaridades a genes associados a elementos gênicos móveis, como elementos de inserção de sequência (IS), bacteriófagos e plasmídios (HOLDEN et al., 2004).

A *B. mallei* nem sobrevive bem no meio-ambiente, nem tem seu reservatório natural muito amplo, concentrando-se nos eqüinos. Os achados relacionados a

comparação dos dois genomas permitem, por exemplo, atribuir algumas relações antes não consideradas, tais como a questão das análises específicas de regiões contendo os elementos móveis extra-cromossômicos que demonstraram várias diferenças. Uma sugestão ou

especulação que se poderia fazer sobre as prováveis inserções ausentes em *B. mallei* seria a de que elas também limitariam o poder adaptativo da espécie, o que parece lógico diante das evidências detectadas na comparação entre os dois genomas.

Tabela 4 – Ilhas genômicas presentes no genoma de *Burkholderia pseudomallei*.

Ilha Genômica	Tamanho, Kb	Seqüências
Cromosso mo 1	Cromosso mo 1	
GI 1	12,6	AGGCGTCGTTGA
GI 2	36,2	CCGCGCGCGAGCCGAGCGCCCGCGTGC GGCGCGATGCG ATCGAGCG
GI 3	51,3	GGAAACGCGAACACGGAATTCAGGCGTGCCGAATGAAATC CG
GI 4	39,7	GCCGTACAGCTCGGAAATGTACTGGAAG
GI 5	11,7	ATGCTTTCGG
GI 6	15,0	GGCGAAAAGCGTCGAGCGCGC
GI 7	5,9	GGCTTCGCGA
GI 8	92,3	CGACCGCAATCGCCAGCACGACAAGGCCGAACAGCGCGAC GAACGAATGCTCGTCGCGCATCGTCGCCGCGAC
GI 9	9,8	CGTGTGTGAATGGACAGCG
GI 10	6,6	TCAGG
GI 11	15,3	CGCGCGAGCCGTAA
GI 12	11,5	GCGCGCGGCCGC
Cromosso mo 2	Cromosso mo 2	
GI 13	19,0	ACAGAAATATCGCGA
GI 14	18,6	CGCGAGAACACTGAG
GI 15	34,6	TTGCCCGAAGTGCGGCGACGGCGAGCCGGAAGTGTGCACG AC
GI 16	61,8	CGCTGCGTCTTCTTGATCGGCAGCTCGCCGACGAAAAGGG

Fonte: Adaptado a partir de Holden et al. (2004).

Perfis de Comparação: *B. mallei* e *B. pseudomallei* em números e paralelos.

Antes mesmo do sequenciamento dos dois genomas (*mallei* e *pseudomallei*),

estudos com hibridizações DNA-DNA já sugeriam que as espécies eram intimamente relacionadas. Um relato de tipagem de multilocus de *B. pseudomallei* e *B. mallei* isolados ao redor do mundo, inclusive, chegou a propor que a *B. mallei* poderia ser considerada um clone de *B. pseudomallei* (Rogul, et al., 1970; Godoy, et al., 2003). Embora as cepas de *B. mallei* pareçam ter evoluído mais recentemente a partir de um ancestral de *B. pseudomallei*, há grandes diferenças com relação ao tamanho dos dois genomas; o genoma de *B. pseudomallei* é pelo menos 1.31Mb maior que o de *B. Mallei*. Nossas análises foram capazes de ressaltar, inclusive, que esta diferença também se associa ao número e densidade de ilhas genômicas, similar ao observado por HOLDEN et al. (2004). Ao comparar os cromossomos, os achados revelaram porcentagens médias de singularidade em 16% para o cr1 e em 31% para o cr2 de *B.*

pseudomallei em comparação aos cromossomos equivalentes em *B. mallei*. Inversamente, porém, apenas 1% do cr1 e 4% do cr2 de *B. mallei* são únicos em relação aos cromossomos equivalentes em *B. pseudomallei*. Estes números ajudam a desvendar alguns aspectos intrigantes da capacidade inata de *B. pseudomallei* que deve estar relacionada a uma eventual perda de inserções.

Nota-se que a maioria das regiões únicas/singulares do cr2 de *B. mallei* consiste em trechos de DNA acima de 2Kb de extensão. A única grande região de diferença no cr2 de *B. mallei* é um fragmento de 41Kb, o qual é encontrado no cr1 de *B. pseudomallei*, aparentemente resultante de uma transposição inter-cromossômica. Comparações entre os dois genomas também revelam que houve uma quantidade significativa de rearranjos intra-cromossômicos em *B. mallei*, resultantes de recombinações

entre um grande número de elementos IS repetitivos neste genoma. - Plasticidade genética: Comparações entre *B. mallei* e *B. pseudomallei* revelam que ambos possuem ferramentas de plasticidade genética, ou seja, regiões responsáveis por produzir fatores de virulência e proteínas que permitem ao organismo “burlar” as intempéries do ambiente. Um ponto diferencial concreto, porém, é a diferença com relação às ilhas genômicas: ausentes em *B. mallei* e presentes em *B. pseudomallei*, o que tem sido responsável pela hipótese de que essas ilhas genômicas possam tornar o organismo *B. mallei* incapaz de habitar tantos nichos diferentes quanto o *pseudomallei* (HOLDEN et al., 2004).

- Densidade gênica: *B. mallei* é composta por dois cromossomos circulares, no qual o cromossomo 1 contém 3,51Mb e o segundo contém 2,32Mb (WILLIAM et al., 2004), ou seja, possui um tamanho de

cromossomos bem menores que *B. pseudomallei*. Em *B. mallei* há 171 Inserções de Sequência (IS), correspondendo a aproximadamente 3,1% do seu genoma, enquanto que em *B. pseudomallei* (cepa-K96243) foram encontradas apenas 42 destas inserções. Ao todo são 627 genes no cr 1 e 919 genes no cr 2 em *B. mallei*, o qual não variou se comparado com *B. pseudomallei*. Por esses genes de *B. mallei* serem pequenos e em menor número, podemos inferir que não haja produção substancial de proteínas que permitam a sobrevivência desta bactéria em nichos ecológicos variados, o que implica em hábitos mais restritos (somente hospedeiros específicos como os equinos), diferentemente da *B. pseudomallei*, que habita diferentes ambientes.

- Fatores de virulência e presença de traços de patogenicidade: Embora os

exatos fatores genéticos necessários para a patogenicidade animal e humana por *Burkholderia* sejam, a grosso modo, desconhecidos, muitos traços já foram experimentalmente implicados na virulência de *B. mallei* (NIERMAN et al., 2004), *B. pseudomallei* (HOLDEN et al., 2004) e do complexo Bcc (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). *B. pseudomallei* se caracteriza por secretar muitas proteases, lipases e fosfolipases C (DESHAZER et al., 1999), enquanto que *B. mallei* secreta essas substâncias em poucas quantidades. Muitas cepas de *B. mallei* exibem resistência a muitos antibióticos, tendo no seu genoma 33 genes que presumivelmente contribuem para a resistência a essas drogas. Enquanto, por exemplo, *B. pseudomallei* resiste a aminoglicosídeos (MOORE et al., 1999), a *B. mallei* é sensível. A resistência a agentes antimicrobianos catiônicos (como

polimixina B), a presença de um flagelo ativo (URBAN et al., 2004), e a captação de ferro por sideróforos (biosíntese de *pyoverdin* e *pyochelin*) (SOKOL et al., 1999) são traços de virulência e, ao mesmo tempo, de sobrevivência no solo (*habitat* ambiental). O ferro é essencial para a maioria dos organismos, inclusive as bactérias; e, apesar de sua relativa abundância na terra, o ferro não fica livremente disponível aos microorganismos sob condições aeróbicas, já que ele forma hidróxidos férricos pouco solúveis no ambiente ou se liga fortemente a proteínas de transporte e de armazenamento nos hospedeiros mamíferos (ANDREWS et al., 2003). Para adquirir íons de ferro, as bactérias desenvolveram algumas estratégias: a mais comum delas envolve moléculas quelantes de alta-afinidade pelo ferro, denominadas sideróforos (GUERINOT, 1994; WANDERSMAN &

DELEPELAIRE, 2004). Acredita-se que, durante a infecção por *Burkholderia*, haja uma estratégia crítica de defesa do hospedeiro (COOLINS, 2008): a tentativa de reter ferro, tanto dos patógenos invasores quanto da própria circulação sanguínea, o que culmina num seqüestro de ferro no interior das células de defesa (macrófagos em particular) e pode levar a um ambiente celular favorável, rico em ferro, aos patógenos.

Diversos genes que podem mediar a resistência a espécies reativas de oxigênio também estão presentes e eles possibilitam que a *Burkholderia* possa sobreviver no interior dos ambientes intracelulares. *B. mallei* e *B. pseudomallei* codificam alguns homólogos de fosfolipase e de protease tipo-LasA, respectivamente, em seus repertórios de fosfolipases, proteases, e colagenases, os quais já foram diretamente implicados na virulência de *Burkholderia* (CHAIN et

al., 2006). Alguns dos genes correlatos de metabolismo de aminoácidos, inclusive dois de porina completamente exclusivos *B. mallei* e *B. pseudomallei*, são altamente conservados nas duas espécies. Atente-se para o fato de que a porina tem sido implicada diretamente no processo inflamatório da infecção por *Burkholderia spp.* (CHAIN et al., 2006), embora ainda não haja elementos mais conclusivos sobre tal papel (SCHELL et al., 2008 SITTHIDET et al., 2008). Como esperado, *B. mallei* e *B. pseudomallei* também carecem de homólogos dos genes do operon *cabA* de *B. cenocepacia*, até agora tidos como exclusivos das cepas mais potentes causadores de infecção na fibrose cística (DUBARRY et al., 2006). Contudo, similar a outros genomas de *Burkholderia*, as duas espécies aqui tratadas possuem vários genes putativos de adesinas tipo-hemaglutinina, responsáveis pela ligação a células

eucarióticas: um deles, listado na **Tabela 5** (BMAA1756/ BPSS1727), codifica uma proteína exclusiva de *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

Tabela 5. Lista selecionada de ORFs (*open reading frames*) dos genes putativos de fatores de virulência presentes nos genomas de *Burkholderia mallei* e de *Burkholderia pseudomallei*, extraída a partir de extensa relação publicada como potencial “viruloma” das duas espécies (650 genes; Schell et al., 2008). Na presente relação estão listados, por ordem de relevância neste estudo, apenas os genes sem ortólogos conhecidos em cinco espécies não-patogênicas de *Burkholderia*, incluindo *B. thailandensis* e possivelmente relacionados com a atividade patogênica de formação de granulomas/piogranulomas, exceto fatores de transcrição.

<i>B. mallei</i> ^a	<i>B. pseudomallei</i> ^a	Descrição ^b	PMP (daltons) ^c
BMAA058 7	BPSS0747	outer membrane porin protein, 1004758:1005855, forward	39148
BMAA181 7	BPSS0252	putative porin membrane protein, 339553:340752, forward	41355
BMA1023	BPSL1628	putative fimbrial usher protein , 1885085:1887637, forward	90636
BMA1021	BPSL1626	putative fimbrial subunit type 1 precursor , 1883679:1884209, forward	17462
BMA1022	BPSL1627	putative fimbrial assembly chaperone precursor, 1884308:1885078, forward	27240
BMA1024	BPSL1629	putative exported fimbria-related protein , 1887634:1888599, forward	33265
BMA3276	BPSL0225	putative flagellar hook-length control protein , 235424:236833, reverse	44556
BMAA111 7	BPSS1266	putative peptide/siderophore synthetase , 1716573:1719821, reverse	117188
BMAA122 0	BPSS0996	Rieske iron-sulphur domain protein , 1316050:1317054, reverse	37555
BMAA175 6	BPSS1727	putative hemagglutinin related protein , 2368050:2370794, reverse	95030
BMAA038 1	BPSS2119	putative metallo-beta-lactamase family protein , 2868176:2868916, forward	25874
BMAA101 9	BPSS1271	putative phosphopantetheine binding protein , 1735403:1735735, reverse	12183
BMAA175 7	BPSS1728	putative secretion/activator protein , 2370877:2372568, reverse	61161

<i>B. mallei</i> ^a	<i>B. pseudomallei</i> ^a	Descrição ^b	PMP (daltons) ^c
BMA1268	BPSL1876	putative phospholipase , 2232808:2234328, forward	55129
BMAA156 2	BPSS1557	putative glyoxalase , 2113012:2113470, forward	16678
BMAA120 1	BPSS1010	putative halogenase , 1379351:1381072, forward	64309
BMAA111 8	BPSS1267	putative MbtH-like protein , 1719868:1720074, reverse	7583
BMA0841	BPSL2062	OmpA family protein , 2467187:2467897, reverse	24698

^a Os loci BMA e BPSL são parte do replicon principal; os loci BMAA e BPSS do replicon secundário (menor).

^b Descrição = nome do gene na anotação aceita mais atual, posição no cromossomo e fita codificante (se reversa ou forward).

^c Peso Molecular Predito = predição feita para cada produto gênico anotado do genoma de *B. pseudomallei*.

compartilhada poderia ser um excelente alvo para estudos experimentais *in vitro*, o que consiste exatamente no grande benefício de investigações por métodos de bioinformática, os quais podem reduzir sobremaneira o número de candidatos aos ensaios de bancada. Um outro operon recentemente estudado, por análise proteômica, foi o do fator sigma E alternativo (RpoE), envolvido na tolerância ao estresse e na sobrevivência

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genomas de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, recentemente analisados por investigações detalhadas e complexas

(THONGBOONKERD et al., 2007).

Segundo esses autores o operon RpoE pode interferir na expressão diferencial de 52 proteínas, um conjunto muito interessante de elementos potencialmente chaves para a virulência de *Burkholderia*, mas, novamente, apenas um começo de identificação dos candidatos ideais a serem alvos de experimentos de comprovação biológica *in vivo* e *in vitro*.

(CHUA et al., 2003; FUSHAN et al., 2005; SCHELL et al., 2008; SITTHIDET et al., 2008, dentre outras), contêm muitos genes responsáveis por promover a

síntese de fatores de virulência envolvidos na patogenicidade da relação célula-hospedeiro e na síntese de proteínas responsáveis pela ubiquidade dessas espécies, especialmente a *B. pseudomallei*. Alguns dos fatores de virulência mais conhecidos são os flagelos de *B. pseudomallei* (CHUA et al., 2003), a secreção de proteínas do tipo III (STEVENS et al., 2002), as fímbrias e as proteínas de adesão às células hospedeiras. Também há a produção de substâncias responsáveis pela ocupação de diferentes nichos, tais como os sideróforos e as substâncias que neutralizam a ação de antibióticos (beta-lactamases, cefalosporinases, aminoglicosidase acetiltransferases), entre outras. O estudo *in silico* mais detalhado de regiões genômicas particulares (replicons, regiões de inserção, ilhas genômicas e de patogenicidade, elementos moveis extra-cromossômicos,

p.ex.) se faz necessário, uma vez que essas regiões são responsáveis por causar variedade e plasticidade sutilmente diferenciáveis nos genomas das duas espécies de *Burkholderia*. Tal discernimento pode ter como consequência um melhor entendimento sobre as trajetórias patogênicas que cada uma das bactérias segue no hospedeiro mamífero, ajudando a esclarecer, assim, tanto a patogenia das doenças por elas causadas, quanto a perspectiva de desenvolvimento futuro de vacinas baseando-se nos alvos moleculares identificados em levantamentos como o ora apresentado.

Referências Bibliográficas

- ACHA, P.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 Ed. Organizacion Panamericana de La salud/ Washinton, 989p, 1986.
- ADAGRO; Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco. <http://www.adagro.pe.gov.br>. 2008. Fanny

Simis, Ana Carolina Messias de Souza, Aderaldo Alexandrino de Freitas. Ocorrência Do Mormo No Estado De Pernambuco (2003-2006).

ALIBASOGLU, M.; YESILDERE, T.; CALISLAR, T.; CALSIKAN, U. Malleus outbreak in lions in the Istanbul Zoo. Berl Munch Tierarztl. H. Wochenschr. v. 99, p.57-63, 1986.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANDREWS, S. C., ROBINSON, A.K., RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol Rev** v.27, p.215–237, 2003.

ATKINS, T.; PRIOR, R.G.; MACK, K.; RUSSELL, P.; NELSON, M.; OYSTON, P. C. F.; DOUGAN, G.; TITBALL, R. W. A mutant of *Burkholderia pseudomallei*, auxotrophic in the branched chain amino acids biosynthetic pathway, is attenuated and protective in a murine model of melioidosis. **Infect. Immun.** v.70, p.5290– 5294, 2002.

BERNIER, S.P., SILO-SUH, L., WOODS, D.E., OHMAN, D.E., SOKOL, P.A. Comparative Analysis of Plant and Animal

Models for characterization of *Burkholderia cepacia* Virulence. **Infect. Immun.**, v.71, p.5306-5313, 2003.

BRAGA, M.D.M.; ALMEIDA, P.R.C. Primeira descrição de um caso autopsiado de melioidose no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.38, n.1, p.58-60, 2005.

BUELL, C.R., JOARDAR, V., LINDEBERG, M., et al. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA v.100, p.10181–10186, 2003.

BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* v.40, p.115-117, 1950.

Burkholderia Genome Database - http://burkholderia.com/b_cenocepacia.jsp
CDC report. Centers for Disease Control and Prevention, USA Govnt. Laboratory-acquired human glanders—Maryland, May 2000. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* v.49, p.532-535, 2000.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases (ZVED) USA Govnt. 2008. <http://www.cdc.gov/nczved>.

CHAIN, P.S.G., DENEFF, V.J., KONSTANTINIDIS, K.T., et al. Inaugural Article: *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors multi-replicon, 9.73Mpb genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.103, p.15280-15287, 2006.

CHAOWAGUL, W., WRITE, N., DANCE, D.A.B., et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis.* v.159, p.890–898, 1989.

CHUA, K.L., CHAN, Y.Y., GAN, Y.H. Flagella Are Virulence Determinants of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.** v.71, p.1622–1629, 2003.

COLLINS, H.L. Withholding iron as a cellular defence mechanism - friend or foe? **European Journal of Immunology** v.38, n.7, p.1803–1806, 2008.

CURRIE, B.J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travelers returned from endemic regions. **Eur. Respir. J.** v.21, p.1069–1077, 2003.

CURRIE, B.J., FISHER, D.A., ANSTEY, N.M., JACUPS, S.P. Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and re-activation. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.94, p.301-304, 2000.

DA SILVA, A.C.R., FERRO, J.A., REINACH, F.C., et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities, **Nature** v.417, p.459–463, 2002.

DANCE, D.A.B. Melioidosis. *Current Opinion in Infectious Disease* v.15, p.127- 32, 2002.

DUBARRY, N., PASTA, F., LANE, D. ParABS Systems of the Four Replicons of *Burkholderia cenocepacia*: New Chromosome Centromeres Confer Partition Specificity. **Journal of Bacteriology.** v.188, n.4, p.1489-1496, 2006.

DESHAZER, D., BRETT, P. J., BURTNICK, M.N., WOODS, D.E. Molecular Characterization of Genetic Loci Required for Secretion of Exoproducts in *Burkholderia pseudomallei*. **J. Bacteriol.** v.181, p.4661–4664, 1999.

DOBRINDT U, HOCHHUT B, HENTSCHEL U, HACKER J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Rev Microbiol** v.2, p.414–424, 2004.

EDGAR, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, v.19, p.113, 2004.

EDDY, S.R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics**, v.14, p.755–763, 1998.

EGAN, E.S., FOGEL, M.A., WALDOR, M.K. Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. **Mol. Microbiol.**, v.56, p.1129-1138, 2005.

FUSHAN, A.; MONASTYRSKAYA, G.; ABAEV, I. et al. Genome-wide identification and mapping of variable sequences in the genomes of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **Res Microbiol.**, v.156, p.278–288, 2005.

GAN, Y.H.; CHUA, K.L.; CHUA, H.H.; LIU, B.P.; HII, C.S.; CHONG, H.L. TAN, P. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. **Mol Microbiol.**, v.44, p.1185–1197, 2002.

GENEDB - Wellcome Trust Functional Genomics Development Initiative, Pathogen's Sequencing Unit. www.genedb.org

GILLIGAN, P.H., LUM, G., VANDAMME, P., WHITTIER, S. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. In P. R. Murray, E. J.

BARON, M.A. PFALLER, F. C. TENOVER, AND R. H. YOLKEN (ed.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, DC. p. 729-748, 2003.

GODOY, D., RANDLE, G., SIMPSON, A. J. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.2068–2079, 2003.

GOUGH J, KARPLUS K, HUGHEY R, CHOTHIA C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **J Mol Biol.**, v.313, n.4, p.903-19, 2001.

GOUVEIA, J.J., VASCONCELOS, E.J.R., PACHECO, A.C.L., et al. Intraflagellar transport (IFT) complex in *Leishmania* spp.: *In Silico* genome-wide screening and annotation of gene function. **Genet Mol Res.**, v.6, n.4, p.675-689, 2007.

HACKER J, CARNIEL E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. **EMBO Rep** v.2, p.376–381, 2001.

HARVEY, S.P., MINTER, J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.44, p.91-97, 2005.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. Microbiologia Veterinária. 1º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 446p, 2003.

HOLDEN, M.T.G., TITBALL, R.W., PEACOCK, S.J., et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **PNAS**, v.101, n.39, 2004.

JONES, A.L., BEVERIDGE, T.J., WOODS, D.E. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.**, v.64, p.782-790, 1996.

KOLSTO, A.B. Time for a fresh look at the bacterial chromosome. **Trends Microbiol.**, v.7, p.223-226, 1999.

KOONPAEW, S., UBOL, M.N., SIRISINHA, S., WHITE, N.J., CHAIYAROJ, S.C. Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with melioidosis in Thailand. **Acta Trop.**, v.74, p.187-191, 2000.

LETUNIC, I., COPLEY, R.R., PILS, B., PINKERT, S., SCHULTZ, J., BORK, P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. **Nucleic Acids Res.**, v.34, p.D257-D260, 2006.

LIVNY, J., YAMAICHI, Y., WALDOR, M.K. Distribution of Centromere-Like parS Sites in Bacteria: Insights from Comparative Genomics. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.23, p.8693-8703, 2007.

LESSIE, T.G., HENDRICKSON, W., MANNING, B.D., DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiol Lett.** v.144, p.117-128, 1996.

LOPEZ, J., COPPS, J., WILHELMSSEN, C. et al. Characterization of experimental equine glands. **Microbes Infect.**, v.5, p.1125-1131, 2003.

MAHENTHIRALINGAM, E., URBAN, T.A., GOLDBERG, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, p.144-156, 2005.

MOORE, R.A., DESHAZER, D., RECKSEIDLER, S.L., WEISSMAN, A., WOODS, D.E. Efflux-Mediated Aminoglycoside and Macrolide Resistance in *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.43, p.465-470, 1999.

- MOTA, R.A., BRITO, M.F., CASTRO, F.J.C., MASSA, M. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.* v.20, n.4, p.155-159, 2000.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov
- NELSON, K.E., WEINEL, C., PAULSEN, I.T., et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.*, v.4, p.799–808, 2002.
- NIERMAN, W.C., DESHAZER, D., KIM, H.S., et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *PNAS*, v.101, n.39, p.14246-14251, 2004.
- O’QUINN, A.L.; WIEGAND, E.M.; JEDDELOH, J.A. *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cell Microbiol.*, v.3, p.381– 393, 2001.
- OU, K.; ONG, C.; KOH, S.Y. et al. Integrative genomic, transcriptional and proteomic diversity in natural isolates of the human pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *J Bacteriol.*, v.187, p.4276–4285, 2005.
- PATHEMA – UM CENTRO DO NIAID Bioinformatics Resource Center (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, dos EUA). <http://pathema.jcvi.org/Burkholderia/beta/>
- PDB – Protein Data Bank - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.G. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*, Porto Alegre: Artmed, 2005.
- ROGUL, M., BRENDLE, J.J., HAAPALA, D. K. & ALEXANDER, A. D. Nucleic Acid Similarities Among *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas multivorans*, and *Actinobacillus mallei*. *J. Bacteriol.*, v.101, p.827–835, 1970.
- ROLIM, D.B., VILAR, D.C.F.L., SOUSA, A.Q., MIRALLES, I.S., et al. Melioidosis, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* v.11, n.9, 2005. Disponível <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no09/05-0493.htm>
- ROTZ, L.D., KHAN, A.S., LILLIBRIDGE, S.R., OSTROFF, S.M., HUGHES, J.M. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis.*, v.8, n.2, p.225-230, 2002.
- RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* v.16, p.944-945, 2000.

- SALANOUBAT, M., GENIN, S., ARTIGUENAVE, F., et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**. 415, 497–502, 2002.
- SCHELL, M.A., LIPSCOMB, L., DeSHAZER, D. Comparative genomics and an insect model rapidly identify novel virulence genes of *Burkholderia mallei*. **J Bacteriol.** v.190, n.7, p.2306-2313, 2008.
- SITTHIDET, C., STEVENS, J.M., CHANTRATITA, N. et al. (2008). Prevalence and sequence diversity in natural populations of *Burkholderia* species. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.2418-2422.
- SOKOL, P.A., DARLING, P., WOODS, D.E, MAHENTHIRALINGAM, E., KOOI, C. Role of Ornibactin Biosynthesis in the Virulence of *Burkholderia cepacia*: Characterization of pvdA, the Gene Encoding L-Ornithine N5-Oxygenase. **Infect Immun.**, v.67, p.4443–4455, 1999.
- STEVENS, M.P., HAQUE, A., ATKINS, T., et al. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis. **Microbiology**, v.150, p.2669-76, 2004.
- STEVENS, M., WOOD, M.W., TAYLOR, L.A. et al. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen. **Mol. Microb.**, v.46, p.649–659, 2004.
- STOVER, C.K., PHAM, X.Q., ERWIN, A. L., et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, **Nature**. v.406, p.959–964, 2000.
- THANBICHLER, M., SHAPIRO, L. Chromosome organization and segregation in bacteria. **J. Struct. Biol.**, v.156, p.292-303, 2006.
- THONGBOONKERD, V., VANAPORN, M., SONGTAWEE, N., et al. Altered Proteome in *Burkholderia pseudomallei* rpoE Operon Knockout Mutant: Insights into Mechanisms of rpoE Operon in Stress Tolerance, Survival, and Virulence. **J. Proteome Res.**, v.6, n.4, p.1334 -1341, 2007.
- UniProt - Universal Protein Resource – www.uniprot.org/
- URBAN, T.A., GRIFFITH, A., TOROK, A.M., SMOLKIN, M.E., BURNS, J.L., GOLDBERG, J.B. Contribution of *Burkholderia cenocepacia* Flagella to Infectivity and Inflammation. **Infect Immun.**, v.72, p.5126–5134, 2004.

VIGIAGRO, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008). Instrução Normativa nº 24, de 5 de abril de 2004. www.agricultura.gov.br/portal

WILSON, G.S., MILES, A. Glanders and Melioidosis, p.1714-1717. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Edward Arnold, London, 1964.

WHITE, N. J. Melioidosis. Lancet v.361, p.1715-1722, 2003.

WHITMORE, A. An account of a glanders-like disease in Rangoon. **J. Hyg.**, v.13, p.1-34, 1913.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H.; et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (PALLERONI & HOLMES, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.

YAMAICHI, Y., FOGEL, M.A., MCLEOD, S.M., HUI, M.P., WALDOR, M.K. Distinct Centromere-Like *parS* Sites on the Two Chromosomes of *Vibrio spp.* **Journal of Bacteriology**. v.189, n.14, p.5314-5324, 2007.