

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**Sequenciamento e caracterização de fragmentos de DNA de *Brucella abortus* gerados por SE-AFLP.**

Ester Souza Lopes  
Bióloga

Dissertação de Mestrado

Abril de 2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**Sequenciamento e caracterização de fragmentos de DNA de *Brucella abortus* gerados por SE-AFLP.**

Ester Souza Lopes  
Bióloga

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Área de concentração: Microbiologia do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abril de 2010

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

L864s Lopes, Ester Souza

Sequenciamento e caracterização de fragmentos de DNA de *Brucella abortus* gerados por SE-AFLP / Ester Souza Lopes. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Marisa da Costa

1. *Brucella* 2. *Brucella abortus* – patogenicidade 3. *Brucella abortus* – genética 4. Brucelose 5. Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados I. Costa, Marisa da, orient. II. Título.

CDU 579.84 (043)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo auxílio, força e iluminação em todas as etapas da minha vida.

À minha mãe querida, meu eterno agradecimento pelo apoio, amor e confiança em todas e quaisquer situações.

Aos amigos pela compreensão dos momentos em que estive ausente e por todo o incentivo nos momentos de desânimo. Uma lembrança especial à Cristina Fadanelli e Eber Oliveira que foram incansáveis com seu apoio em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório 165 do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Albino Magalhães Neto, Jozi Fagundes Mello e Laura Rocha pela amizade, companheirismo e auxílio. À Marjo Bessa por dividir comigo seu conhecimento que foi de extrema importância.

Ao Laboratório de Parasitologia, especialmente ao Professor João Henrique Corrêa Kanan por disponibilizar o uso de equipamentos necessários ao desenvolvimento deste trabalho e pelas dicas técnicas sugeridas.

A todos os professores do PPGMAA pela fundamental contribuição ao meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço em especial à Professora e amiga Marisa da Costa por ter sido a pessoa que me recebeu “em seu” laboratório como aluna de mestrado, possibilitando meu acesso à pesquisa. Agradeço seu voto de confiança, sua orientação e ao brilhante exemplo de postura profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro, pois sem isso não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora, Professoras Amanda de Souza da Motta, Gertrudes Corção e Marisa Cardoso, pela importante contribuição neste trabalho.

## Sequenciamento e caracterização de fragmentos de DNA de *Brucella abortus* gerados por SE-AFLP.

Autor: Ester Souza Lopes

Orientador: Dra. Marisa da Costa

### RESUMO<sup>1</sup>

Espécies de *Brucella* são causadoras da brucelose, uma das doenças zoonóticas mais difundidas em todo o mundo, que é causa aborto em animais domésticos e infecção potencialmente debilitante em humanos. Apesar da identificação de diferentes espécies dentro do gênero, baseada na diferença de hospedeiro e patogenicidade, o gênero tem sido descrito como geneticamente homogêneo. Técnicas moleculares têm sido empregadas com o intuito de diferenciar e tipificar estes microrganismos, sendo que a abordagem mais promissora visa a identificação de polimorfismos entre as espécies e biovars. O objetivo do trabalho foi analisar o perfil genético de diferentes cepas de *B. abortus* obtidos a partir da técnica de SE-AFLP a fim de determinar a sequência dos fragmentos obtidos e genes que poderiam estar presentes nos fragmentos selecionados e compará-las com bancos de genes e de proteínas de procariotos. Foram selecionados 19 fragmentos, que foram purificados, sequenciados e, as sequências obtidas, submetidas a diversas ferramentas de bioinformática visando sua caracterização e identificação. Nenhum dos fragmentos de nucleotídeos apresentou similaridade entre si e/ou com outra sequência já conhecida de outros microrganismos, inclusive com sequências conhecidas do gênero *Brucella*. Das 114 proteínas hipotéticas geradas pela tradução destas sequências genômicas 57% (65 sequências) apresentaram baixo grau de similaridade com proteínas descritas e disponíveis em BLASTp (proteínas não-redundantes e SwissProt), variando entre 29 e 43. Do total de proteínas similares 85% foram atribuídas a proteínas funcionais e 14% a proteínas hipotéticas. Essas novas sequências deverão ser utilizadas em outros trabalhos visando verificar sua abrangência e especificidade dentro das espécies e biovars de *Brucella*.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101p.) Abril, 2010.

## Sequencing and characterization of DNA fragments from *Brucella abortus* generated by SE-AFLP

Author: Ester Souza Lopes

Advisor: Dra. Marisa da Costa

### ABSTRACT<sup>2</sup>

*Brucella* species are the cause of brucellosis, one of the most widespread zoonotic diseases around the world, which is cause abortion in domestic animals and potentially debilitating infection in humans. Despite the identification of different species within the genus, based on the difference of host and pathogenicity, the genre has been described as genetically homogeneous. Molecular techniques have been employed in order to differentiate and classify these organisms, and the most promising approach aims to identify polymorphisms between species and biovars. The objective of this study was to analyze the genetic profile of different strains of *B. abortus* obtained by the technique of SE-AFLP to determine the sequence of the fragments obtained and genes that may be present in the selected fragments and compare them to databases of genes and proteins in prokaryotes. We selected 19 fragments that were purified, sequenced and the sequences obtained, subject to several bioinformatics tools aiming at its characterization and identification. None of the fragments showed nucleotide similarity between themselves and / or other sequence already known from other organisms, including known sequences of the genus *Brucella*. Of the 114 hypothetical proteins generated by translation of genomic sequences 57% (65 sequences) showed low level of similarity to proteins described and available in blastp (protein non-redundant and SwissProt), ranging between 29 and 43. Of the proteins similar 85% were attributed to functional proteins and 14% to hypothetical proteins. These new sequences should be used in other studies to verify its completeness and specificity within the species and biovars of *Brucella*.

---

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101p.) April, 2010.

## SUMÁRIO

	<b>RELAÇÃO DE TABELAS E QUADROS .....</b>	<b>x</b>
	<b>RELAÇÃO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>04</b>
2.1.	O gênero <i>Brucella</i> .....	04
2.1.1.	<i>Brucella abortus</i> .....	06
2.2.	Brucelose .....	07
2.2.1.	Brucelose humana .....	07
2.2.2.	Brucelose animal .....	09
2.2.3.	Brucelose no Brasil .....	10
2.3.	Patogenicidade de <i>Brucella</i> sp.....	11
2.4.	Diagnóstico .....	16
2.4.1.	Em humanos .....	18
2.4.2.	Em animais .....	20
2.5.	Relação genética .....	20
2.6.	Técnicas moleculares .....	22
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1.	Obtenção de fragmentos .....	25
3.1.1.	A reação de PCR .....	26
3.1.2.	Eletroforese .....	27
3.1.3.	Purificação dos fragmentos de DNA .....	27
3.1.4.	Eletroforese para quantificação e verificar purificação .....	29

3.2.	Sequenciamento .....	29
3.3.	Análise das sequências obtidas .....	30
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1.	Seleção de fragmentos .....	32
4.1.1.	A partir dos perfis gerados com o oligonucleotídeo iniciador H1-A.....	32
4.1.2.	A partir dos perfis gerados com o oligonucleotídeo iniciador H1-G.....	32
4.1.3.	A partir dos perfis gerados com o oligonucleotídeo iniciador H1-C.....	33
4.1.4.	A partir dos perfis gerados com o oligonucleotídeo iniciador H1-T.....	33
4.2.	Análise das sequências .....	34
4.2.1.	Fragmento 1.1. gerado com H1-A.....	34
4.2.2.	Fragmento 1.2. gerado com H1-A.....	36
4.2.3.	Fragmento 3 gerado com H1-A.....	38
4.2.4.	Fragmento 4 gerado com H1-G.....	41
4.2.5.	Fragmento 8 gerado com H1-G.....	42
4.2.6.	Fragmento 9 gerado com H1-G.....	44
4.2.7.	Fragmento 4 gerado com H1-C.....	45
4.2.8.	Fragmento 7 gerado com H1-C.....	48
4.2.9.	Fragmento 8 gerado com H1-C.....	50
4.2.10.	Fragmento 9 gerado com H1-C.....	53
4.2.11.	Fragmento 11 gerado com H1-C.....	54
4.2.12.	Fragmento 2 gerado com H1-T.....	58
4.2.13.	Fragmento 3 gerado com H1-T.....	61
4.2.14.	Fragmento 4 gerado com H1-T.....	63
4.2.15.	Fragmento 5 gerado com H1-T.....	66
4.2.16.	Fragmento 6 gerado com H1-T.....	67
4.2.17.	Fragmento 8 gerado com H1-T.....	69
4.2.18.	Fragmento 9 gerado com H1-T.....	71
4.2.19.	Fragmento 10 gerado com H1-T.....	73



5.	CONCLUSÕES .....	83
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
7.	REFERÊNCIAS .....	85
8.	APÊNDICE 1 .....	95
	APÊNDICE 2 .....	96

## RELAÇÃO DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Lista de genes de virulência de <i>Brucella</i> , suas funções e efeitos de deleções	15
<b>Tabela 1.</b>	Cepas de <i>Brucella</i> com genoma sequenciado e disponível no GenBank.....	23
<b>Tabela 2.</b>	Dados das cepas de <i>B. abortus</i> utilizadas neste estudo.....	26
<b>Tabela 3.</b>	Dados dos fragmentos de DNA de <i>B. abortus</i> selecionados .....	35
<b>Tabela 4.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 1.1 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-A..	39
<b>Tabela 5.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 1.2 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-A..	39
<b>Tabela 6.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 4 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-G ....	46
<b>Tabela 7.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 8 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-G ....	46
<b>Tabela 8.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 9 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-G ....	49
<b>Tabela 9.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 4 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.....	49
<b>Tabela 10.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 7 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.....	52
<b>Tabela 11.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 8 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.....	55
<b>Tabela 12.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 9 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.....	57
<b>Tabela 13.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 11 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C...	59
<b>Tabela 14.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 3 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.....	64
<b>Tabela 15.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 5 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.....	72
<b>Tabela 16.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 8 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.....	72
<b>Tabela 17.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 9 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.....	75
<b>Tabela 18.</b>	Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 11 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T ..	76

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

BLASTn: basic local alignment search toll nucleotide

BLASTp: basic local alignment search toll protein

bp: pares de base

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GC: guanina-citosina

IS: sequências de inserção

LPS: lipopolissacarídeo

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

PCR: reação em cadeia da polimerase

PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

RFLP: polimorfismo no comprimento do fragmento digerido

rRNA: ácido ribonucleico ribossômico

SE-AFLP: polimorfismo de fragmento amplificado utilizando uma enzima única

SB: borato de sódio

TBE: tampão Tris-Borato-EDTA

xg: força de centrifugação

WHO: World Health Organization

## 1. INTRODUÇÃO

*Brucella* sp. são os agentes causadores da brucelose, uma doença infecciosa que afeta diversas espécies animais e pode ser transmitida para humanos por contato direto com animais infectados ou indiretamente por contaminação de produtos lácteos. Mais de 500 mil novos casos de brucelose em humanos são anualmente comunicados, e segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), a magnitude do problema é subestimada.

A infecção por *Brucella* pode causar doenças crônicas em humanos com o envolvimento de múltiplos órgãos e baixa mortalidade, enquanto que em animais domésticos pode levar ao insucesso reprodutivo com consequente perdas econômicas.

Sendo uma zoonose, a detecção da brucelose nos animais é essencial para a prevenção da doença em humanos. A simples identificação do gênero bacteriano é suficiente, porém, para programas de erradicação de brucelose, que incluem regulamentos que estipulam uma resposta espécie específica, ou então, para se realizar um rastreamento epidemiológico, a identificação da espécie ou biovar envolvida é muito importante.

A busca de alternativas para a tipificação de *Brucella* sp. de forma rápida e mais segura (por diminuir o manuseio) têm sido estudada por vários

autores com resultados as vezes surpreendentes, pois algumas delas produzem uma diferenciação capaz de individualizar cada cepa isolada. O problema no desenvolvimento de ferramentas moleculares ocorre pela falta de demonstrar o polimorfismo genético de *Brucella* sp. e muitos laboratórios dependem da tipificação convencional para identificar espécies de *Brucella*. Uma das mais promissoras abordagens moleculares atualmente utiliza polimorfismo de DNA.

Em trabalho desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) - UFRGS, tese de doutorado de Albino Magalhães Neto, foi utilizada técnica SE-AFLP para tipificação da coleção de cepas de diferentes espécies de *Brucella* do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, utilizando a enzima *HindIII*. Neste estudo foram observados diferentes perfis genéticos após eletroforese. Esta técnica não gerou um perfil padrão para cada espécie, mas sim agrupou diferentes espécies em um mesmo perfil, assim como gerou perfis exclusivos de amostras de campo, que diferiram dos perfis que incluíam cepas de referência. Foi observada uma grande variabilidade de perfis para cepas de campo de *B. abortus* que apresentavam fragmentos exclusivos, assim como também observamos que determinados fragmentos ocorreram com grande frequência, muitas vezes em todos os perfis gerados a partir de determinado oligonucleotídeo iniciador. Assim o presente trabalho visa a continuidade do estudo de cepas, especialmente de *B. abortus*. Para isso foram escolhidos alguns fragmentos exclusivos e outros comuns às *B. abortus* estudadas com o objetivo de analisar o perfil genético de diferentes cepas de *B. abortus* obtidos

a partir da técnica de SE-AFLP a fim de determinar a sequência dos fragmentos obtidos e genes que poderiam estar presentes nesses fragmentos selecionados e compará-las com banco de genes e de proteínas de procariotos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O gênero *Brucella*

*Brucella* são os agentes causadores da brucelose que afeta diversas espécies animais e é transmitida aos seres humanos de várias maneiras (Cassataro *et al.*, 2004; Delpino *et al.*, 2004). São encontradas na maioria dos continentes, inclusive em ecossistemas marinhos (Cloeckaert *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004).

O gênero é composto por bactérias Gram negativas na forma de pequenos cocobacilos, que aparecem normalmente isolados ou em pares, não excedem o tamanho de 2µm, são imóveis, catalase positivos e normalmente oxidase positivos, produzem H<sub>2</sub>S, não produzem indol, são aeróbios, mas podem necessitar de adição de CO<sub>2</sub> no cultivo *in vitro* (principalmente em isolamentos primários) (Alton *et al.*, 1988). São patógenos intracelulares facultativos de diversos mamíferos domésticos e silvestres, podendo também causar infecções graves em humanos (Rouot *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2006; Fugier *et al.*, 2007). Apresentam uma concentração aproximada de guanosina e citosina de 57% em seu genoma (Del Vecchio *et al.*, 2002; Lavigne *et al.*, 2005). Estas bactérias têm uma extrema preferência pelo meio intracelular,



apesar da sua capacidade de viver fora das células do hospedeiro (Concepción *et al.*, 2006).

*Brucella* foi inicialmente considerada como sendo relacionada com os gêneros *Bordetella* e *Alcaligenes*. Mais tarde análises de sequências genéticas do rRNA 16S confirmaram a sua inclusão no subgrupo alfa-2 de Proteobactérias que também inclui *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Ochrobactrum*, entre outros gêneros (Alvarez *et al.*, 2006; Gândara *et al.*, 2001; Fugier *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2000). O gênero apresenta relação com patógenos de plantas e simbioses tais como *Rhizobium* sp. e *Agrobacterium* sp., com parasitas intracelulares como *Bartonella* sp. e *Rickettsia* sp. e com as bactérias oportunistas e de vida livre como *Ochrobactrum* sp. e *Rhodobacter* sp. (Jumas-Bilak *et al.*, 1998a; López-Goñi & Moriyón, 2004).

Estudos moleculares têm indicado que um organismo não-patogênico de solo é, possivelmente, o ancestral de *Brucella* (Wattan *et al.*, 2009). Foster *et al.* (2009) através de análises filogenéticas, separou o gênero em cinco grandes clados, inferindo *B. ovis* como a espécie basal para o gênero *Brucella*.

Atualmente, existem nove espécies reconhecidas de *Brucella*, com base nas preferências de hospedeiro, diferenças fenotípicas e patogenia: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (cães), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (suínos, renas e lebres), *B. microti* (pequenos roedores do leste europeu), *B. pinnipidialis* (pinípedes) e *B. ceti* (cetáceos) (Corbel & Banai, 2005; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008). Entre estas, cinco são virulentas para o ser humano (*B. melitensis*, *B.*

*abortus*, *B. suis*, *B. canis* e *B. pinnipidialis*) (CloECKaert *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Fugier *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008). Em nível genético, os membros do gênero são altamente conservados o que dificulta sua diferenciação molecular (Fox *et al.*, 1998; Delpino *et al.*, 2004; Halling *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2007).

Classicamente, isolados de *Brucella* são divididos em espécies por um procedimento de tipificação que avalia uma série de propriedades relacionadas à fisiologia, fenótipo, fagotipagem e propriedades antigênicas. Algumas espécies são divididas em biovares ou biotipos, distinguíveis por uma análise demorada, de aproximadamente 25 características fenotípicas (Alton *et al.*, 1988, Corbel & Banai, 2005). Tais análises estão sujeitas a diferentes interpretações e devem ser executadas por técnicos qualificados pelo risco de contaminação (García-Yoldi *et al.*, 2006). Baseado nos traços fenotípicos, *B. abortus* tem sido dividida em 7 biovares, *B. melitensis* em 3 biovares e *B. suis* em 5 biovares (Bricker, 2002).

### **2.1.1. *Brucella abortus***

No Brasil a brucelose em bovídeos é causada principalmente por *B. abortus*, que causa perdas de produção devido a problemas de reprodução do rebanho (Corner *et al.*, 1987). Ela pode ser encontrada ocasionalmente em outros animais (cães, equinos, camelos, coiotes, roedores selvagens, cabras selvagens europeias) devido ao contato desses animais com materiais contaminados após aborto de rebanhos infectados (Almeida *et al.*, 2004, Baek

*et al.*, 2003). *B. abortus* pode ser transmitida aos seres humanos através de animais infectados, contato direto com fetos abortados, membranas fetais ou através do consumo de leite cru e produtos derivados (Romero & Lopez-Goñi, 1999). Esta espécie apresenta 7 biovars, todos relacionados com infecção principalmente de bovídeos (Alton *et al.*, 1988).

## **2.2. Brucelose**

Embora programas de erradicação tenham conseguido diminuir a sua prevalência nos países mais desenvolvidos, a doença é ainda presente em certas áreas do mundo, sendo continuamente importada para áreas não endêmicas pelo transporte ilegal de animais e pelo homem através de viagens internacionais, pelo consumo de produtos alimentares contaminados (Pappas *et al.*, 2005a; Roushan *et al.*, 2006; Gorvel, 2008). A brucelose está controlada em grande parte da Europa e nos EUA, porém está aumentando em certas partes do mundo, especialmente em áreas em desenvolvimento como a região do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Ocidental, partes da África e América Latina, e tem sido classificada como uma zoonose negligenciada (Pappas *et al.*, 2006; WHO, 2006; Fugier *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2009).

### **2.2.1. Brucelose Humana**

A brucelose afeta mais de meio milhão de indivíduos todos os anos, sendo que a infecção em humanos é acidental, sendo muito mais comum em

animais. A infecção humana pode ocorrer através da exposição à *Brucella* em laboratórios por exposição a aerossóis, sendo reconhecido como um organismo de nível de biossegurança tipo 3 (Concepción *et al.*, 2006; Grilló *et al.*, 2006). Mas a forma mais frequente de transmissão aos humanos é pela ingestão de produtos cárneos e laticínios contaminados. Se não for detectada pode resultar em sequelas, porém é raramente fatal (Young, 1995).

Em humanos, a brucelose está associada com um amplo espectro de sintomas e as complicações podem incluir artrite, sacroilíte, espondilite e efeitos sobre o sistema nervoso central. Raramente pode causar aborto em mulheres grávidas e orquite e epididimite em homens (Khan *et al.*, 2001; Mantur *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2007).

As espécies mais frequentes causadoras de infecção em humanos por ordem de patogenicidade são *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* (Ko & Splitter, 2003). O significado dos isolados de *Brucella* sp. provenientes de mamíferos marinhos, precisa ainda ser estabelecido como uma fonte de infecção para mamíferos terrestres. Existem relatos de infecções humanas por algumas dessas cepas, tanto por acidentes de laboratório como em pessoas não consideradas de risco ocupacional (Sohn *et al.*, 2003).

A importância da doença humana reside no fato de que ela pode induzir morbidade crônica e exige tratamento complexo e prolongado, que nem sempre são eficazes na eliminação da infecção (Pappas *et al.*, 2005a). O período de incubação da doença é variado, o aparecimento dos sinais pode levar até dois meses na fase aguda, entre dois e 12 meses na fase subaguda e até 12 meses para evolução de um quadro crônico (Mantur *et al.*, 2007).

Embora a brucelose seja uma doença de notificação obrigatória, em muitos países, os dados oficiais não refletem totalmente o número de casos anuais, sendo a incidência verdadeira estimada entre 10 e 25 vezes maior do que tem sido relatado (Nimri, 2003).

### **2.2.2. Brucelose Animal**

A doença causa impacto significativo na pecuária, pois a infecção por *Brucella* causa aborto e esterilidade em animais domésticos. A doença é a maior causa de perdas econômicas diretas e uma barreira para o comércio e exportações (Pappas *et al.*, 2006; WHO, 2006; Fugier *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2009). Anualmente, o impacto econômico da brucelose bovina, no Brasil, tem sido estimado em 32 milhões de dólares (Poester *et al.*, 2002).

Animais domésticos e selvagens adquirem brucelose através da ingestão de leite contaminado, contato com os tecidos e fluidos contaminados associados com parto ou aborto e através do sêmem (Fugier *et al.*, 2007).

A brucelose foi erradicada ou severamente restringida em alguns países ocidentais por uma combinação rigorosa de programas de higiene animal e inocuidade dos alimentos. No entanto, regiões oficialmente reconhecidas como "livres de brucelose" estão sob ameaça constante através da reintrodução de animais contaminados (Whatmore *et al.*, 2005).

Em situações endêmicas, a vacinação é a única forma adequada para controlar a brucelose em ruminantes (Grilló *et al.*, 2006). Em muitos países industrializados, a brucelose em animais foi efetivamente controlada

através da vacinação, quarentena e programas de vigilância. O elevado custo destes programas de controle pode ter um grande impacto sobre a economia agrícola (Roop *et al.*, 2004; Fugier *et al.*, 2007).

A probabilidade de determinada espécie animal adquirir a infecção por *Brucella* sp. depende de uma combinação de fatores, incluindo, a suscetibilidade do hospedeiro, o número de microrganismos ingeridos, o manejo e fatores ambientais (Cloeckert *et al.*, 2003).

### **2.2.3. Brucelose no Brasil**

A brucelose bovina devido a *B. abortus* é a mais prevalente no Brasil, seguida por *B. suis* em suínos. A brucelose em ovinos e caprinos apresenta um impacto econômico mais discreto sendo considerada de menor importância, isso devido à ausência de *B. melitensis* no país. *Brucella ovis* não é patogênica ao homem, porém causa a epididimite ovina. Foi primeiramente descrita no Rio Grande do Sul em 1972 e continua sendo um problema negligenciado nos rebanhos ovinos (Magalhães Neto & Gil-Turnes, 1996). A brucelose canina é causada por *Brucella canis* tem sido detectada através de sorologia e isolamento em cães e tem baixa patogenicidade no homem comparando-se com *B. abortus* e *B. suis* (Poester *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) brasileiro, verificando a ineficácia das medidas adotadas, elaborou e lançou, no início de 2001, o Programa Nacional de Controle Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Trata-se de um programa

harmonizado com as condutas preconizadas por órgãos internacionais e suficientemente flexíveis a ponto de permitir sua implementação nos heterogêneos estados brasileiros (Brasil, 2006).

Para levantamento da situação epidemiológica da brucelose bovina foi estabelecido um termo de cooperação técnica entre o MAPA e Universidades de diferentes estados. Já foram concluídos os estudos em 15 estados brasileiros, que juntos detêm 82,12% dos bovinos brasileiros de corte e leite. A maior prevalência de focos de brucelose bovina foi identificada nos estados de Rondônia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, variando entre 21,21% e 41,6%, enquanto que a menor prevalência foi registrada nos estados da Região Sul com 0,30% – 4,00%. Este estudo indica uma distribuição heterogênea da situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil (Neto, 2009).

### **2.3. Patogenicidade de *Brucella* sp.**

Bactérias patogênicas utilizam uma variedade de fatores que lhes conferem virulência, como a capacidade de sobreviver às respostas imunológicas de plantas e animais (Alvarez *et al.*, 2006).

O LPS de bactérias Gram negativas é considerado como o principal antígeno bacteriano responsável por induzir a expressão de moléculas pró-inflamatórias e o principal causador da resposta humoral antibacteriana durante a infecção do hospedeiro. Quando liberado durante a divisão e/ou morte das bactérias, o LPS é captado pelos macrófagos que iniciam uma série de

respostas anti-inflamatórias (Lapaque *et al.*, 2006). O LPS é uma das moléculas chaves envolvidas nos mecanismos de patogenicidade de *Brucella* sp. e, por apresentar quatro epítomos específicos (A, M, C e R), sua detecção é utilizada na identificação fenotípica (López-Goñi & Moriyón, 2004).

Em geral, bactérias patogênicas possuem mecanismos de defesa adaptados que permitem a sobrevivência no fagócito do hospedeiro. Aqueles que sobrevivem no interior do fagossoma tendem a mudar sua fisiologia, alterando os seus padrões de expressão proteica em resposta ao novo ambiente (Kim *et al.*, 2000). *Brucella* no interior do macrófago estão protegidas não só do sistema imune (anticorpos, complemento), mas também de antibióticos ativos *in vitro* que não atingem concentrações terapêuticas nestes compartimentos intracelulares (Concepción *et al.*, 2006).

*Brucella* sp. são caracteristicamente capazes de se multiplicar intracelularmente em uma variedade de células. A patogenicidade de *Brucella* não está relacionada com a produção de toxina clássica, cápsula antifagocítica, adesinas proteicas ou fatores de virulência codificados por plasmídeo. Por outro lado, a baixa endotoxicidade do lipopolissacarídeo (LPS), a resistência a uma vasta gama de peptídeos catiônicos bactericidas e a capacidade de prevenir fusão do lisossoma e localização no compartimento do fagossoma, são as características de *Brucella* provavelmente relacionadas à patogenicidade. Como a membrana externa desempenha um papel crítico na interação da bactéria com o ambiente, acredita-se que o conjunto de propriedades da membrana externa de *Brucella* está relacionado ao seu parasitismo intracelular (Velasco *et al.*, 2000). Além disso, a análise das



espécies de *Brucella* tem demonstrado que alguns genes como, por exemplo, de flagelos estão presentes, mas não são expressos e, mais interessante, que estes genes não funcionais aparentemente têm importância na patogenicidade (Moreno & Moriyón, 2002).

*Brucella* utiliza mecanismos diversos para evitar ou suprimir a resposta bactericida dos macrófagos. Sellem *et al.* (2008) revisaram os fatores de virulência que ajudam *Brucella* a invadir e sobreviver nos macrófagos (Quadro 1).

Os mecanismos utilizados por *Brucella* que causam doença não estão bem compreendidos. É muito provável que estas bactérias não dependam somente de um simples fator de virulência para sua patogenicidade. Em vez disso, a virulência de *Brucella* pode ser um aspecto integrado da sua fisiologia geral em concordância com mediadores moleculares específicos. Lamontagne *et al.* (2007) demonstraram que *Brucella* é capaz de um remodelamento amplo e reversível da composição protéica do seu envelope celular no ambiente intracelular. O patógeno pode, portanto, ser capaz de adaptar amplamente sua fisiologia em resposta a diferentes microambientes encontrados durante seu ciclo de vida intracelular. Tal flexibilidade metabólica pode ser necessária, pois *Brucella* encontra microambientes heterogêneos nas células de seu hospedeiro (Lamontagne *et al.*, 2009). Portanto, a patogenicidade é devido à habilidade de adaptação às condições ambientais encontradas no nicho replicativo intracelular, incluindo baixos níveis de nutrientes e oxigênio, pH ácido e subprodutos intermediários do oxigênio (Kohler *et al.*, 2002; Sellem *et al.*, 2008).

A doença geralmente ocorre após sua entrada no hospedeiro, sendo o sistema monocítico-macrofágico o alvo para o patógeno, onde este é capaz não apenas de sobreviver, mas também de se replicar. O patógeno evade as defesas do hospedeiro através da inibição da fusão do endossoma com lisossoma, atingindo o retículo endoplasmático (Concepción *et al.*, 2006).

As espécies de *Brucella* que apresentam morfologia colonial lisa (presença de cadeia O no LPS) inibem a apoptose das células do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência intracelular da bactéria, por escapar da fagocitose das células do sistema imune do hospedeiro, enquanto que espécies mutantes de morfologia rugosa (deficientes em cadeia O no LPS) induzem a necrose nos macrófagos (Pei & Thomas, 2004; Pei *et al.*, 2006). Contudo, os mecanismos e fatores de virulência que medeiam a morte celular dos macrófagos não têm sido identificados (Sellem *et al.*, 2008).

Em bovinos em gestação a colonização do tecido trofoblástico da placenta é frequente. Durante um aborto há eliminação de tecidos e fluidos contendo cargas elevadas de *Brucella* sp., o que coloca em grave risco sanitário os rebanhos e tratadores, especialmente em instalações cheias. A infecção também reduz a fertilidade, causa perda de peso e reduz a produção de leite dos animais (Gorvel, 2008).

**Quadro 1.** Lista de genes de virulência de *Brucella*, suas funções e efeitos de deleções.

Gene	Função proposta	Efeitos de deleções	Referências
alquil peróxido redutases ( <i>ahcC</i> & <i>ahpD</i> )	Proteção contra danos graves pelo oxigênio	Atenuado em C57BL6J, mas não em ratos BALB/c	Sellem <i>et al.</i> , 2008
Reparo por excisão de base	Proteção de <i>Brucella abortus</i> contra danos oxidativos <i>in vitro</i>	aumentar a susceptibilidade a ROIs <sup>1</sup> e ROI/nitrogênio reativo	Hornback e Roop (2006)
<i>Brucella</i> fator de virulência A ( <i>bvfA</i> )	Pode desempenhar função na fixação no nicho intracelular	Atenuado em ratos BALB/c e linhagem celular J774A.1	Lavigne <i>et al.</i> (2005)
Catalase (CAT)	Protege a célula do estresse oxidativo	Aumenta a susceptibilidade para peróxido de hidrogênio.	Gee <i>et al.</i> (2004) Kim <i>et al.</i> (2000)
$\beta$ -1, 2-glucanas ciclica (C $\beta$ G)	Interfere no tráfico celular por ativação do transporte lipídico encontrado na membrana celular do hospedeiro e previne a fusão ciclica fagossoma-lisossoma	Atenuado em ratos BALB/c e células HeLa <sup>2</sup>	Arellano-Reynoso <i>et al.</i> (2005) Briones <i>et al.</i> (2001)
Citocromo oxidase ( <i>cydDCAB</i> )	Adaptação a baixa tensão de oxigênio, prevenindo o acúmulo de radicais livres oxidativos e detoxificando o compartimento intracelular	Sensibilidade a inibidores respiratórios azida sódica e zinco, espécies altamente reativas de oxigênio, baixo pH e virulência atenuada em ratos BALB/c	Endley <i>et al.</i> (2001)
Lipopolissacarídeos (LPS)	Inibição da atividade do complemento, proteção contra peptídeos catiônicos bactericidas, desempenha um papel na entrada e sobrevivência inicial dentro dos macrófagos, previne a síntese de mediadores imunes, inibe apoptose celular do hospedeiro	Sensível a ação de soro normal e complementar, atenuada em ratos BALB/c	Forestier <i>et al.</i> (2000) Forestier <i>et al.</i> (1999) Lapaque <i>et al.</i> (2005) Moreno <i>et al.</i> (1998) Allen <i>et al.</i> (1998)
Oxido nítrico redutase ( <i>norD</i> )	Sobrevivência sob muito baixa tensão de oxigênio, detoxificação de NO	Atenuado em ratos BALB/c e linhagem celular J774A.1	Loisel-Meyer <i>et al.</i> (2006)
Superoxido dismutase	Protege contra ruptura	Atenuada em ratos C57BL6J e macrófagos correspondentes peritoneais, mas não em ratos BALB/c e linhagem celular J774A.1	Gee <i>et al.</i> (2005) Latimer <i>et al.</i> (1992) Tatum <i>et al.</i> (1992)
Sistema de secreção tipo IV ( <i>virB</i> )	Translocação de fatores de virulência dentro de células de mamíferos	Incapazes de adquirir membranas ER, perdeu sua capacidade de se multiplicar em células HeLa e purificadas em ratos BALB/c infectados	Celli and Gorvel (2004) O'Callaghan <i>et al.</i> (1999) Sieira <i>et al.</i> (2000)
Urease ( <i>ure</i> )	Protege <i>Brucella suis</i> e <i>Brucella abortus</i> durante sua passagem através do estômago	Atenuada pela rota oral em ratos BALB/c	Bandara <i>et al.</i> (2004) Sangari <i>et al.</i> (2007)

Fonte: Sellem *et al.* (2008)

<sup>1</sup>ROI: intermediários reativos de oxigênio.

<sup>2</sup>Células HeLa: linhagens de células utilizadas em cultivo celular, que apresentam alta durabilidade.

Estudo de Bardensteins *et al.* (2009), indicou que as brucelas não apenas sobrevivem nos trofoblastos, mas também são capazes de se replicar em organelas como o retículo endoplasmático rugoso. Neste estudo, concluiu-se que *Brucella* persiste no hospedeiro como parasita intracelular replicante, cronicamente infecta células fagocíticas profissionais do sistema retículo-endotelial, ou, ainda, em uma segunda fase, causa de infecção aguda do trofoblasto, onde se reproduz e induz placentite, infecção fetal e aborto (Pei & Thomas, 2004).

#### **2.4. Diagnóstico**

A bacteriologia é muito importante na confirmação de uma suspeita clínica no estudo da epidemiologia da doença e também como confirmação dos resultados encontrados nos testes sorológicos. O isolamento da bactéria é o método mais específico, e embora seja mais complexo na realização, é considerado o padrão ouro mesmo com o advento das metodologias de detecção de DNA (Bounaadja *et al.*, 2009).

Diagnóstico definitivo e incontestável de brucelose pode ser obtido pelo isolamento do agente etiológico, porém esse procedimento é caro, demorado e exige recursos laboratoriais nem sempre disponíveis, o que inviabiliza seu uso em larga escala, como requer um programa de controle da enfermidade. Embora seja o teste diagnóstico mais específico, a taxa de isolamento é geralmente baixa, os resultados não estão disponíveis imediatamente e o processamento de grande número de amostras dificulta o

diagnóstico (Mediavilla *et al.*, 2003). Além disso, o tempo mínimo para isolamento e identificação da espécie é de oito dias considerando um crescimento ótimo de 48 horas, mas períodos de até trinta dias podem ser necessários. Além de ser um processo lento, a bacteriologia também requer técnicos experientes e está associada ao risco de infecções adquiridas em laboratório, exigindo pessoas bem treinadas e instalações adequadas para o trabalho com esses microrganismos (Alton *et al.*, 1988; Bricker, 2002; Navarro *et al.*, 2004).

Para o isolamento, os meios de cultura seletivos são os mais utilizados (Alton *et al.*, 1988). Nos isolamentos primários, as culturas de *Brucella* sp. são incubadas à 35-37°C e examinadas diariamente pelo menos durante 30 dias. O meio de cultura Farrell é amplamente usado para o isolamento de *Brucella* de animais domésticos, mas outros meios base podem ser adotados, como o ágar sangue, ágar soja tripticaseína e Thayer Martin, dependendo do tipo material coletado (Alton *et al.*, 1988).

Após o isolamento, a tipificação em nível de biovar exige, além de testes fisiológicos e bioquímicos de execução simples, outros testes mais sofisticados e que não estão disponíveis em muitos laboratórios, que são a tipificação por bacteriófagos e pela sorologia com soros específicos aos seus antígenos presentes no LPS. O teste com bacteriófagos implica em um cuidado minucioso no laboratório devido ao risco de contaminação das cepas padrão e outros isolados com estes vírus. O trabalho com soros específicos é laborioso e exige experimentos de inoculação em animais para a produção do soro e consequente purificação ou a importação destes reagentes. Por esta razão,

ainda não existe, no Brasil, um laboratório que disponha de todas as ferramentas para a tipificação de *Brucella* sp.

Testes sorológicos para a detecção da resposta imunitária do animal são amplamente utilizados para diagnóstico de brucelose humana e animal, devido a sua simplicidade de execução e interpretação (Mediavilla *et al.*, 2003). A sorologia é um teste diagnóstico rápido, mas apresenta alguns problemas de sensibilidade, necessitando o uso concomitante de, no mínimo, duas técnicas para a detecção da grande maioria dos reagentes (Alton *et al.*, 1988; Godfroid *et al.*, 2002). A sorologia detecta o contato com a bactéria, não discrimina o contato por doença ou vacinação e não é capaz de diferenciar a espécie ou biovar envolvido.

#### **2.4.1. Em humanos**

Infecções humanas por *Brucella* são difíceis de diagnosticar devido ao amplo espectro de manifestações clínicas associadas a elas. Brucelose em humanos é subdiagnosticada e subnotificada, e estima-se que pelo menos 25 casos ignorados ocorram no mundo para cada caso que é diagnosticado (Dames *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2005b; Mantur *et al.*, 2006). O diagnóstico é feito com segurança quando os organismos são recuperados a partir do sangue, medula óssea ou de outros tecidos. Hemocultura é o método de escolha, mas é frequentemente dificultado pela baixa sensibilidade e atraso no crescimento em função da baixa concentração de bactérias encontradas em pacientes com bacteremia por *Brucella* sp. (McCabe *apud* Mantur *et al.*, 2008).

A maioria dos relatos de infecção humana no Brasil está relacionada com indivíduos que trabalham ou habitam regiões rurais. As espécies isoladas foram *B. abortus* e *B suis* biovar 1 (INPPAZ, 1994; Santos Neto *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2002). No mínimo uma infecção humana por acidente em laboratório no Brasil foi descrita (Godoy *et al.*, 1979). Infecção natural humana causada pela *B. canis*, no Brasil, foi indiretamente revelada por testes sorológicos de um indivíduo e pelo cultivo da bactéria a partir do animal de estimação deste indivíduo (Roxo *et al.*, 1990).

#### **2.4.2. Em animais**

Nos animais, o diagnóstico pode ser sorológico ou através do isolamento do microrganismo a partir dos órgãos, tecidos e secreções como leite, sangue, esperma, secreções vaginais e estomacais (Alton *et al.*, 1998).

Por causa das dificuldades no isolamento bacteriológico e também pelos custos, os programas de combate à brucelose baseiam-se no diagnóstico sorológico, recurso que permite a realização de um grande número de testes, com resultados adequados a um custo acessível (Mathias *et al.*, 2007).

Técnicas sorológicas clássicas atuam principalmente na detecção de anticorpos para LPS, dando origem a reações falso-positivas devido à reatividade cruzada com LPS de algumas bactérias. Além disso, anticorpos contra LPS também são induzidos em animais vacinados com cepas atenuadas de *Brucella* sp. (Mediavilla *et al.*, 2003). Estes e outros inconvenientes têm alimentado um crescente interesse na detecção de anticorpos alternativos

contra antígenos, principalmente proteínas da membrana externa e proteínas citoplasmáticas (Cassataro *et al.*, 2004).

Existem vários testes para o diagnóstico de brucelose. Cada teste possui características que são importantes em determinada etapa do controle dos rebanhos. Todos possuem problemas de inespecificidade, principalmente relacionados com infecções do rebanho com *Yersinia enterocolitica* O:9. O único teste imunológico que tem comprovado especificidade é o teste intradérmico com brucelina (Pouillot *et al.*, 1997; Godfroid *et al.*, 2002).

A escolha dos testes a serem utilizados no diagnóstico da brucelose deve ser de acordo com a situação epidemiológica de cada região, pois a incidência e prevalência da doença vão influenciar nessa escolha (Godfroid *et al.*, 2002).

No Brasil, as provas recomendadas pelo PNCEBT são Teste do Antígeno Acidificado e o Teste do Anel, como testes de triagem, e o Teste do 2-mercaptoetanol e a Fixação do Complemento, como testes confirmatórios (Brasil, 2006).

## **2.5. Relação genética**

Espécies de *Brucella* têm uma composição genética muito semelhante, mas apresentam virulência variada em diferentes hospedeiros. Foi estimado que divergiram uma da outra por apenas uma pequena percentagem na sequência nucleotídica (Kim *et al.*, 2000).



O gênero pode ser distinguido pela sequência do gene rRNA 16S (Gee *et al.*, 2004) e as espécies e biovars podem ser diferenciadas com uma série de testes microbiológicos tradicionais, sorologia e características fenotípicas (Alton *et al.*, 1988).

As espécies de *Brucella* apresentam uma homologia de mais de 96% após hibridização DNA-DNA (Verger *et al.*, 1985). As sequências de rRNA 16S de *B. abortus* e de outras oito espécies são também semelhantes 98,5 a 99,7%. A utilização de sequências conservadas como a do gene rRNA 16S muitas vezes não distingue espécies estreitamente relacionadas (Fox *et al.*, 1998). Tem sido demonstrado que apesar desta grande homologia de rRNA existem variações quanto ao número e posições de determinados genes, o que tem auxiliado na caracterização de espécies e cepas de *Brucella* sp. (Halling *et al.*, 1993 ; Ouahrani *et al.*, 1993; Cloeckart *et al.*, 1996 ; Bricker *et al.*, 2000).

Algumas grandes deleções e rearranjos têm sido relatados dentro de uma espécie ou biovars, porém as maiores diferenças genéticas consistem de polimorfismo de um único nucleotídeo (Jumas-Bilak *et al.*, 1998b; Bricker *et al.*, 2000; Cloeckart *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2009). Raras são as regiões de grande variabilidade entre espécies e biovars (Bricker, 2002). A pouca variação genética em *Brucella* deve-se, provavelmente, à *Brucella* sp. ser um gênero evolutivamente recente, assim como também não há provas de transferência gênica transversal entre as espécies, embora alguma ilhas genômicas coerentes com transferência horizontal de outras bactérias tenham sido observadas (Paulsen *et al.*, 2002; Ratushna *et al.*, 2006). Alguns estudos indicam ocorrência esparsa de mutação e eventos raros de

recombinação, e sugerem uma estrutura populacional primária clonal para o gênero *Brucella* (Paulsen *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2008).

As relações filogenéticas entre as espécies de *Brucella* permanecem pouco conhecidas, mas essa determinação é essencial para a compreensão da sua ecologia, história evolutiva, de hospedeiros relacionados e para desenvolver métodos precisos de genotipagem (Foster *et al.*, 2009).

A sequência completa de 25 diferentes cepas pertencentes a sete espécies de *Brucella* já estão disponíveis e confirmam o alto grau de similaridade das sequências genômicas entre elas (Chain *et al.*, 2005; Viadas *et al.*, 2009). As cepas com genomas sequenciados encontram-se na Tabela 1.

O genoma de *Brucella* consiste de dois cromossomos circulares sem plasmídeos, sugerindo uma diferença notável quando comparado ao cromossomo único de muitas bactérias (Michaux *et al.*, 1993, 1997). A comparação desses cromossomos têm confirmado algumas características de polimorfismo deste gênero em genes que codificam proteínas, bem como em sequências de inserção (IS) (Salhi *et al.*, 2003; Halling *et al.*, 2005).

## **2.6. Técnicas moleculares**

A digestão enzimática do genoma com enzimas de corte frequente no gênero *Brucella*, como em outros microrganismos, demonstrou claramente a necessidade da associação de diferentes técnicas que facilitem a diferenciação entre cepas ou biovars de uma mesma espécie. Até o momento não foi

possível a tipificação utilizando esta metodologia, sendo que diversos trabalhos acabaram por individualizar cepas invés de agrupar as diferentes espécies em perfil exclusivo para cada uma delas (O'hara *et al.*, 1985; McGillivery *et al.*, 1988).

**Tabela 1.** Cepas de *Brucella* com genoma sequenciado e disponível no GenBank.

<b>Espécie</b>	<b>Biovar</b>	<b>Cepa</b>
<i>B. abortus</i>	2	86/8/59
	3	Tulya
	4	292
	6	870
	9	C68
	não disponível	NCTC 8038
	não disponível	2308 A
<i>B. ceti</i>		B1/94
		Cudo
	não dividida em biovares	M13/05/1
		M490/95/1 M644/93/1
<i>B. melitensis</i>	1	Rev.1
	1	16M
	2	63/09
	3	Ether
<i>B. neotomae</i>	não dividida em biovares	5K33
<i>B. pinnipidialis</i>		B2/94
	não dividida em biovares	M163/99/10 M292/94/1
<i>B. suis</i>	3	686
	4	40
	5	513
<i>Brucella sp.</i>		83/13
		F5/99

Fonte: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> consulta em 07/02/2010)

A técnica de PCR-RFLP tem sido utilizada para o gênero *Brucella* apresentando pouca diferenciação entre as espécies e cepas, exceto o gene *omp2* que demonstrou certa heterogeneidade entre as espécies (Bardenstein *et al.*, 2002; Cloeckaert *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de uma gama de técnicas de tipificação com base em DNA (Ouahrani *et al.*, 1993; Bricker & Halling, 1994; Cloeckaert *et al.*, 1995; García-Yoldi *et al.*, 2006; Le Fléche *et al.*, 2006; Ratushna, 2006; Whatmore *et al.*, 2006, 2007) tem complementado as técnicas clássicas e apresentaram correlação significativa com as espécies clássicas de *Brucella* (Dawson *et al.*, 2008).

Fragmentos únicos ocorrem entre os diferentes genomas de *Brucella*, o que permitiu desenvolver uma resposta rápida e específica, em um único ensaio para identificação molecular de todas as espécies conhecidas desse gênero (Garcia-Yoldi *et al.*, 2006). A identificação do biovar ainda não pode ser feita por essa técnica, porém o isolamento e a identificação da espécie e do biovar envolvido é indispensável para uma avaliação precisa da situação epidemiológica dos rebanhos, principalmente no que concerne a detecção da origem da infecção (López-Goñi & Moriyón, 2004).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção de fragmentos de DNA de *B. abortus*, após SE-AFLP utilizando a enzima *HindIII*:

Os fragmentos foram selecionados a partir de trabalho desenvolvido previamente utilizando a técnica de SE-AFLP com a enzima *HindIII* (tese de doutorado, Albino Magalhães Neto). Foram selecionados perfis que apresentaram diferenças em relação aos perfis apresentados pelas cepas de referência e alguns perfis comuns a todas ou à maioria das cepas testadas.

Das 25 cepas de *B. abortus* onde foram observados os fragmentos de interesse, foram selecionados e utilizados os fragmentos de DNA das cepas 577, Ba94, VM88, 8p/04, 14/02, 03/06, 32MG e 16/02 que representaram a totalidade de perfis gerados pelo SE-AFLP. Os dados das cepas utilizadas encontram-se na Tabela 2. Os fragmentos de interesse foram aqueles que ocorreram exclusivamente em perfis de amostras de campo, estando ausentes em perfis de amostras de referência, tornando estes perfis diferentes quando visualizados em gel de agarose, e também fragmentos que ocorreram com frequência em perfis de diferentes espécies de *Brucella*.

A extração, ligação do DNA e digestão enzimática com *Hind*III foram executadas por Magalhães Neto (2010).

**Tabela 2.** Dados das cepas de *B. abortus* utilizadas neste estudo.

<b>Cepa</b>	<b>Origem</b>	<b>Cidade</b>	<b>Região</b>
577	líquido estomacal de feto bovino	Caçapava do Sul	RS
Ba94	leite	Nova Bassano	RS
VM88	linfonódos	Vila Maria	RS
8p/04	líquido estomacal	São Lourenço do Sul	RS
14/02	não informado	Arroio Grande	RS
03/06	leite	Estância Velha	RS
32MG	não informado	Não informado	MG
16/02	aborto	BR 290	RS

### **3.1.1. A reação de PCR:**

A partir do DNA extraído e ligado, foram realizadas as reações de PCR conforme Whatmore *et al.* (2005). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados tinham a base comum 5' GGT ATG CGA CAG AGC TTX 3' onde X era substituído por A, T, G e C, formando quatro oligonucleotídeos diferentes (H1-A, H1-T, H1-G e H1-C).

Em cada reação foram utilizados 12,5ng de DNA, tampão de reação, MgCl<sub>2</sub> 5,0mM, 300ng de um único oligonucleotídeo iniciador, 4.000µM de cada

dNTP (Amresco), 5U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli-Q estéril para um volume final de 50 $\mu$ L.

O DNA foi amplificado em microtubos de 200 $\mu$ L com desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 13 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, reduzindo a temperatura de anelamento de 1°C a cada ciclo, seguido de 17 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 30 minutos, em Mastercycler Personal (Eppendorf).

### **3.1.2. Eletroforese:**

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 0,5x. O marcador utilizado foi o 100bp DNA Ladder (BioLabs). As amostras foram aplicadas em canaletas intercaladas, a fim de facilitar a excisão dos fragmentos de interesse. Foram aplicados 70V em gel de 14x10cm, por aproximadamente 3h. Após o tempo de corrida, o gel foi transferido para solução de brometo de etídio por 15 minutos e em seguida visualizado em transiluminador para identificação do fragmento de interesse, que foi excisado do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi.

### **3.1.3. Purificação dos fragmentos de DNA:**

Foi utilizado o kit "Invisorb® Fragment Clean Up", Invitex, conforme recomendação do fabricante, com algumas modificações.

Os fragmentos foram pesados e colocados em microtubos de 1,5mL. Foram acrescentados 500µL de solução solubilizante para fragmentos de até 150mg e 1mL para fragmentos que pesaram mais de 150mg. Os microtubos foram incubados em banho de água a 50°C por 10 minutos sob agitação até completa dissolução do gel. Foram adicionados 250-500µL de solução de ligação (conforme volume de reação) e homogeneizados por pipetagem ou agitação mecânica. Foram transferidos 800µL da amostra para microtubos de 2mL contendo filtro e centrifugado à 12.000xg por 1 minuto. O filtrado foi descartado. Para reações com volume superior a 800µL o volume residual foi transferido para o mesmo tubo de filtração e repetido o passo de centrifugação.

Foram feitas duas lavagens consecutivas. Em cada uma, foram adicionados 500µL de tampão de lavagem no tubo de filtração, centrifugado por 30 segundos à 12.000xg, e o filtrado foi descartado. Após a lavagem, a amostra foi centrifugada por 4 minutos a 12.000xg para remoção completa do etanol residual. O filtro foi transferido para microtubo de 1,5mL onde foram adicionados 20µL de tampão de eluição e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após decorrido este período, centrifugou-se por 1 minuto à 12.000xg; o filtrado foi transferido novamente para dentro do filtro, incubado a temperatura ambiente por mais 5 minutos e centrifugado por 1,5 minutos por 12.000xg.

O filtro foi descartado e os fragmentos de DNA de interesse purificados foram armazenados a -20°C.



#### **3.1.4. Eletroforese para quantificação e verificar purificação:**

Com o intuito de verificar a eficiência da purificação e quantificar o DNA, foi feita eletroforese conforme Brody & Kern (2004).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida SB 1X (solução de hidróxido de sódio 10mM e pH ajustado para 8,5 com ácido bórico). O gel foi colocado em cuba para eletroforese e foi aplicado 5µL de cada amostra nas canaletas. Foram aplicados 220V em gel de 14x10cm por aproximadamente 30 minutos. Após tempo de corrida, o gel foi transferido para solução de brometo de etídio por 15 minutos e em seguida visualizado em transiluminador para quantificar o DNA. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foram estimados por fluorescência em comparação com o marcador 100bp DNA Ladder (BioLabs) no programa Kodak 1D versão 3.5.2.

Esta eletroforese foi capaz de separar fragmentos que apresentavam número de pares de base muito próximos, que não foram separados na primeira eletroforese, portanto nestes casos, o passo 3.3. “Purificação de Fragmentos de DNA”, foi repetido.

#### **3.2. Sequenciamento:**

Foi realizado um experimento piloto comparando a sequência dos fragmentos purificados utilizando ou não clonagem (Kit para sequenciamento TOPO TA Cloning, Invitrogen). Por não observarmos diferenças significativas

entre os dois sequenciamentos, optou-se pelo sequenciamento direto dos fragmentos purificados do gel de agarose.

Para o sequenciamento, foram colocados em um microtubo de 0,5mL, 5pmol do oligonucleotídeo iniciador que deu origem ao fragmento, 100ng de DNA do fragmento purificado e água Milli-Q estéril para um volume final de 5µL. A amostra foi encaminhada para Ludwig Biotecnologia, instituição prestadora de serviço em sequenciamento de DNA. O sequenciamento foi feito através do Kit Dyanamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE healthcare), no sequenciador automático MEGABACE 1000 (GE healthcare), reação realizada seguindo instruções do fabricante.

### **3.3. Análise das sequências obtidas:**

As sequências passaram por um trabalho de refinamento sendo analisada uma a uma na interface “Chromas” a fim de melhorar sua qualidade. Assim as bases não determinadas no sequenciamento, foram substituídas pelas bases correspondentes.

As sequências foram analisadas em “Edit Sequence” do programa “DNA Star”, a fim de determinar o GC% e obtenção das sequências complementares.

As sequências de nucleotídeos obtidas de todos os fragmentos selecionados foram alinhadas entre elas e comparadas com genomas de *Brucella* e outros microrganismos disponíveis em bancos de dado através do programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Toll nucleotide) utilizando a

opção de “alta similaridade” e “baixa similaridade” conforme Altschul *et al* (1997).

As sequências de nucleotídeos foram traduzidas para sequências de aminoácidos utilizando a ferramenta online “SwissProt” (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). Cada sequência de nucleotídeo originou seis proteínas hipotéticas, resultantes das três diferentes fases de leitura possíveis em 5'-3' e 3'-5'.

As proteínas hipotéticas geradas pelo “SwissProt” foram comparadas com proteínas já descritas e armazenados em bancos de dado através do programa BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool protein) utilizando a opção “sequência de proteínas não-redundantes” e “sequência de proteínas SwissProt”.

Relação de aminoácidos com nomenclatura, símbolo e abreviações encontra-se no Apêndice 1.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Seleção de fragmentos:**

#### **4.1.1. A partir dos perfis gerados com o oligo H1-A**

A partir dos perfis gerados com o oligo H1-A foram selecionados os fragmentos 1 e 3, que continham respectivamente 1.120bp e 883bp. O fragmento 1 ocorreu na maioria dos perfis incluindo perfis que continham outras espécies de *Brucella*, enquanto que o fragmento 3 foi comum a todos os perfis de todas as espécies. Na eletroforese em tampão SB 1X, para quantificação de DNA, foi possível detectar a presença de dois fragmentos de tamanhos muito próximos, um contendo 1.120bp e outro 1.100bp no fragmento 1, sendo identificados respectivamente como f1.1 e f1.2. H1-A não gerou nenhuma banda exclusiva de perfis de *B. abortus* de amostras de campo.

#### **4.1.2. A partir dos perfis gerados com o oligo H1-G**

A partir do oligo H1-G foram selecionados três fragmentos: f4 com 852bp ocorreu com pouca frequência, enquanto que os fragmentos 8 e 9 (565 e 535bp, respectivamente) ocorreram exclusivamente em perfis de amostras de campo.

#### **4.1.3. A partir dos perfis gerados com o oligo H1-C**

Foram selecionados cinco fragmentos a partir do oligo H1-C, sendo que quatro foram selecionados por serem comuns aos diferentes perfis de *Brucella* sp. (f4 com 1.000bp, f7 com 700bp, f9 com 500bp e f11 com 400bp) e um por ser exclusivo de perfil de amostras de campo (f8 com 600bp).

#### **4.1.4. A partir dos perfis gerados com o oligo H1-T**

A partir do oligo H1-T foram selecionados oito fragmentos: três foram selecionados por serem comuns aos diferentes perfis de *Brucella* sp. (f4 com 1.120bp, f5 com 1.020bp e f6 com 850bp), três por ocorrerem com baixa frequência (f8 com 650bp, f9 com 550bp e f10 com 450bp) e dois por serem exclusivos de perfis de amostras de *B. abortus* de campo (f2 com 1.359bp e f3 com 1.236bp).

Foram selecionados um total de 19 fragmentos. Com a finalidade de comprovar a reprodutibilidade da técnica, a metodologia foi aplicada em duplicata em cinco fragmentos, sendo eles, os fragmentos 4 e 7 gerado por H1-C, e os fragmentos 2, 3 e 5 gerado por H1-T.

As cepas utilizadas, oligonucleotídeos iniciadores que deram origem a cada fragmento, fragmentos selecionados com sua ocorrência e conteúdo de GC% encontram-se especificados na Tabela 3. A sequência bruta de oligonucleotídeos (antes do refinamento) de cada fragmento encontra-se no Apêndice 2.

**Tabela 3.** Dados dos fragmentos de DNA de *B. abortus* obtidos por SE-AFLP, selecionados para sequenciamento.

CEPA	FRAGMENTO	OCORRÊNCIA	bp	GC%
<b>H1-A</b>				
577	1.1	cepas de campo e referência	1.120	47,50
577	1.2	cepas de campo e referência	1.000	50,55
577	3	cepas de campo e referência	883	42,08
<b>H1-G</b>				
32MG	4	cepas de campo e referência	852	42,72
32MG	8	cepas de campo	565	52,28
16/02	9	cepas de campo	535	46,73
<b>H1-C</b>				
VM88	4	cepas de campo e referência	1.000	55,94
VM88	7	cepas de campo e referência	700	52,01
8p/04	8	cepas de campo	600	55,67
VM88	9	cepas de campo e referência	500	59,60
VM88	11	cepas de campo e referência	400	53,23
<b>H1-T</b>				
03/06	2	cepas de campo	1.359	49,39
14/02	3	cepas de campo	1.236	49,43
Ba94	4	cepas de campo e referência	1.120	52,95
Ba94	5	cepas de campo e referência	1.020	36,37
Ba94	6	cepas de campo e referência	850	59,41
03/06	8	cepas de campo e referência	650	42,68
Ba94	9	cepas de campo e referência	550	57,17
03/06	10	cepas de campo e referência	450	56,60

## 4.2. Análise das sequências:

### 4.2.1. Fragmento 1.1 gerado com H1-A:

#### 4.2.1.1. Sequência refinada:

```
5'GGCTGTCTCTCATCCCCTTGGGTTTCTTAGGCATGTGCCTTGTTCACGCGTTTGTTCGGGCTAC
CACTTCTTGTGGTGTACTGTGTGCGGATGTTCTCTATCAGCCTTCTTTGCGCGTGGCTACGGCTCGC
GGTTGCTCTGCGACCGGGTTCTCGTCTGTCTATCTCCTTGGATCTTCGGTGCCGTGCCGCCGCTG
TATCGTCCTGGATTGGCCGTTGCCGCTCTGCGGCTTTCTTGGCCCCATGCTTCTCTGGCATATGGTG
ACGTGACGCGTGCGCATGTGTTGACCCTGCGCCTGTGCTGTCGTTTCTGCAGCGCGCTCTCCATT
CCGTTCTGTTGCCGAGCCTAATGTGCCGAGCATTGCTTCTGACTCTTGTGCATCTCTGTTTCGTTT
CCTGGGATGTGCTAGAACTCGTTCTGACTCCCGCTGGGCTCATGCGTGTGCGGCGGAGGCTCCAGT
GGGACTCTAGAGGGATCCACTGGTGGCTGGCAATCCTCCTCCCTGCGCGGGTATTCTCGATATGGC
```

ACGAGCCTTGCCATAGAGAGTGTACGCTGCTAACAATCACAGGACTGTATGCACATTGCAAGTAAAT  
 TGAAATCTTCACAATCCAATGAGGGGATGAACCCTAGGAATCGAAAACGGAGAAAACGCACATATAAT  
 CGAATAGATCTCCAATGGAGATGAATAAACCGATGATGAATATGAACGCCAGCATGAGGGACGGAAA  
 ACAGACAAACGAAGGGAACAGTGTACAAAAAGGAGATGGAATACGGACCCGGCCAGGACGATTGC  
 ATGGACATGGCGCGCTGAAAATTAACAAGAACATAGGACACAATTAACCATCAGACGGTGACGGAC  
 CATTATTGTGCCCTATGATTATCCTATGGTGACAATGAAATGGAGATAAAGAAGTAGTAAAGGGAATAT  
 ATATAGAATATGAAAATGAAAATAAAATGTACCTTATAAATAAAAAGGAAAAACATGAAATATAAAAAA  
 CGATATATAATACGCCAAATCAAGATTAACAACAAAGATAAAGGACACAAAAAAGAACAAAAACAAG  
 AATAACAAAACAGGAATAAAGACGAAATGAAATAAAGA3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### 4.2.1.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

GCLSSPWVS **Stop** ACALFPTRLFGLPLLVLVCADVLYQPSLRVATARGCS  
 ATGVLVCLSPWIFGAVPPPVS SWIGRCR SAAFLAPCFLWH **M** VT **Stop** RVR **M**  
 C **Stop** PCACAVVSAARVSHSVLLPEPNVPEHCFLTLVDLCSFPG **M** C **Stop** NS  
 F **Stop** LPLGSCVCGGSSGTLEGSTGGWQSSSLRGYSSIWHEPCHRECTL  
 LTITGLYAHCK **Stop** N **Stop** NLHNP **M** RG **Stop** TLGIENGENAHIE **Stop** ISNGDE  
**Stop** TDDEYERQHEGRKTDKRREQ **Stop** SKRRWNTDPGQDDC **M** D **M** AR **Stop** K  
 LNKNIGHN **Stop** PSDGDGPLLCP **M** IILW **Stop** Q **Stop** NGDKEVVKGIYIEYENEN  
 K **M** YLINKKEKHEI **Stop** KNDI **Stop** YAKSRLTTKIKDTKKRTKTRITKQE **Stop** RR  
 NEIK

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

AVSHPLGFLRHVPCSPRVCSGYHFLWCYCVRMFSISLLCAWLRLAVALRP  
 GFSSVYLLGSSVPCRRLYRPLAVAALRLSWPHASSGIW **Stop** RDACACVD  
 PAPVLSFLQRASPIPFCCRSL **M** CPSIAF **Stop** LLSISVRS LG CARTRSDSRW  
 AHACAAEAPVGL **Stop** RDPLVAGNPPPCAGIPRYGTSLAIESVRC **Stop** QSQD  
 C **M** HIASEIEIFTIQ **Stop** GDEP **Stop** ESKTEKTHI **Stop** SNRSP **M** E **M** NKP **M** M **M**  
 NAS **M** RDGKQTNEGNSDQKGDGIRTRARTIAWTWRAEN **Stop** TRT **Stop** DTIN  
 HQTVTDHYCAL **Stop** LSYGDNE **M** EIKK **Stop** **Stop** REYI **Stop** N **M** K **M** KIKCTL **Stop** I  
 KRKN **M** KYKKTINYNTPNQD **Stop** QQR **Stop** RTQKKEQKQE **Stop** QNRNKDE **M** K  
**Stop** R

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

LSLIPLGFLGMCLVPHAFVRATTSCGATVCGCSLSAFFARGYGSRLLCDR  
 GSRLSISLDLRCRAAACIVLDWPLPLCGFLGPM LPLAYGDVTRAHVLT LRL  
 CCRFC SARLPFRSVAGA **Stop** CARALLSDSCRSLFVPWDVLELVLT PAGL **M**  
 RVRRRLQWDSRGIHWLAILLPARVFLD **M** ARALP **Stop** RVYAANNHRTVCT  
 LQVKLSSQSNEG **M** NPNRNRKRRTYNRIDLQWR **Stop** INR **Stop** I **Stop** T  
 PA **Stop** GTENRQTKGTVIKKE **M** EYGPGPGR LHGHGALKIKQEHRTQLTIRR  
**Stop** RTIIVPYDYP **M** VT **M** KWR **Stop** RSSKGN IYRI **Stop** K **Stop** K **Stop** NVPYK **Stop** K  
 GKT **Stop** NIKKRYIIRQIKINNKDKGHKKKNKNKNKTGIKTK **Stop** NK

#### **d) 3'5' fase de leitura 1:**

SLFHVFIPVLLFLFLFFFLCPLSLLLILIWRIIYRFFIFHVFPFYL **Stop** GTFY  
HFHILYIFPLLLLYLHFIVTIG **Stop** S **Stop** GTIMVRHRLMVNVCVLCSCLI  
PCPCNRPGPGPYSISFLITVPFVCLFSVPHAGVHIHHRFIHLHWRSIRLYV  
RFLRFRFLGFIPSLDCEDFNFTCNVHTVL **Stop** LLAAYTLYGKARAI  
SRNTRAGRRIASHQWIPLESHWSLRRTRMSPAGVRTSSSTSQGTNRDRQ  
ESENARAH **Stop** APATERNRRALQKRQHRRRVNTCARVTS  
PYARGSMGPRKPKQSGNGQSRTIQAAARHRRSKEIDRREPR  
SQSNREP **Stop** PRAKKADREHPHTVAPQEVVARTNAWGTRH  
MPKKPKGM RDS

#### **e) 3'5' fase de leitura 2:**

LYFISSLFLFCYSCFCSSFFCVLYLCC **Stop** S **Stop** FGVLYIVFLYF  
MFFLFIYKVHFIFIFIFYISLYYFFISISLSP **Stop** DNHRAQ **Stop** WSVTV  
**Stop** WLIVSYVLV**Stop** FSARHVHAIVLARVRIPSPF **Stop** SLFPSFVCFPSL  
MLAFIFIIGLFISIGDLFDYMCVFSVFDS **Stop** GSSPHWIKISISLA  
MCIQSCDC **Stop** QRTLMSARLVYRGI  
PAQGGGLPATSGSL **Stop** SPTGASAAHA **Stop** AQRESERVLAHPRE  
RTEIDKSQKAMLGHIRLRQQNGMGDARCRNDSTGAGSTHAHASRHH  
MPEAWWGQESRRAATANPGRYRRRHGTEPRR **Stop** TDENPGRRATASR  
SHAQRRLIENIRTQ **Stop** HHKKW **Stop** PEQTRGEQGTCLRNPRG **Stop** ETA

#### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

FISFRLYSCFVILVFLVFFVVSFIFVVNLDLAYYISFFYISCF  
SFLFIRYILFSFSYSIYIPFTTSLSPFHCHHRIIIGHNNGPSPSDG  
**Stop** LCPMFLNFQRAMS **M**QSSWP  
GSVFHLDFHCSLRLSVFRPSCWRSYSSSVYSSPLEIYSIICAF  
SPFSIPRVHPLIGL **Stop** RFQFHLQCAYSPIVSSVHSLWQGS  
CHIEEYPRREEDCQPPVDPSRVPLEPPPHTHEPSGSQNEF  
**Stop** HIPGNEQRSTRVRKQCSGTLGSGNRTEWETRAA  
ETTAQAQGM RTRHVTICQRKHGAKKAAERQRPIQDDTGGGT  
APKIQGDRQTRTPVAEQPRAVATRKEG **Stop** **Stop** RTSAH  
SSTTRSGSPNKRVGNKAHA **Stop** ETQGDERQ

O resultado do alinhamento está apresentado na Tabela 4.

### **4.2.2. Fragmento 1.2 gerado com H1-A:**

#### **4.2.2.1. Sequência refinada:**

5'GAGGACTACGAGGCGAAAGGACAGGGGCCCGTTTTATGCATCCTGGAAGTCACTGCTGCCGGCT  
CAGGCTTTCAGAGGCCATGAATATTCGCGGGCTAGTGCTGCCGGAAGTACTGACTTGGAGAGAAAC  
TGGCGAGAGGACTATGGCCGCCCGCGATGGATACTCATCGAGACCGCAAGAGGCATCGTCACGCAC  
ACGTCCAGTGTATCAGGGCACCATAGCACCCGCATACCATGCAGCGCTATCTAGCACTAGCAAGAGC  
ATCGCATTTCCTGTCATCGCGAGCGCACATGGCGCTGCATGCCTCTAGTATACATGAATCAGCGA  
CAGTCGGCTACATCCAGTACAGGAGACATATCGCGATCTAAGCAACGCCTGGTTCGTGATTGAGATTC  
AGAGGGCAATATATTCATGGTGTAGCTTCAGGGCTCAAAAAGAGCCAGGCAAGGCAAAATTCAGGTGT  
TACGCATCTCTGAAAGCGCTACTTGCAACAACCACCAAGTGACAATGGCAATACAAATCGCTATCTC  
CTGGCGCAAGTGTATCGGCACGCTTAACACAATATAGGCACTATCCAACAAACTGGTTGATGAAACACA  
CACAGAAAAGGAATAGAACCACAAAGACACAGATTGGACCAGGCCACCAATGGAGACAATACGGGC  
AGAACAATAAGCACACAAAAGGACCAAAAGCAGCGGCGAGACAGATAACGGACACATCGGATAATCCG  
GCCAAATAAGGCAAAAAACAACCGACATGGGCAACACACAAGACGAGGGACTAGACCAAGAAGAAA  
AGCCACAAGCGAACATAAACCAAAAGGGGCCATGCCAAACACAGGGCACTAGAGGTAACAAAACA  
GGAAAACAACAGGAGGCACGAAATGGACACAAAGAGGGAGCACAATGAGAGAAAAAACGCAAGG  
TGGAGCAAAACCCAGGAGGCAACCGCACGAACACACGCGGACATAATGGACACCAACGCATAACC  
CCAATAGTAAAAAACCAAAAAGAGCGGCACCCACCCAGGAAGGCACGCCAGGAGACCAAGAAGAAC  
ACAAAGGAAGACCACAAAGAAAGGACAAAG3'



A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### 4.2.2.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

EDYEAKGQGPGFMHPGSHCCRLRLSEAMNIRGLVLPPELLDLERNWREDY  
GRRRWILIETARGIVTHTSSVSGHHSTRIPCASAI **Stop H Stop** QEHRIFPCIAS  
AHGAACL **Stop Y T Stop** ISDSRLHPVQETYRDLNSAWFVIQIQRAIYSWCSFR  
AQKEPGKANSGVTHLWKALLATTTK **Stop** QWQYKSLSPGASDRHA **Stop** HNI  
GTIQQTG **Stop Stop** NTHRKGIEPTRHRLDQAHQWRQYGQNKYTQKDQSTR  
RDR **Stop** RTHRIIRPNKAKNNRHGQTHKTRD **Stop** TKKKSHKRT **Stop** TKRGA  
KRALEVKQNRKTNQEARNGHKEGAQ **Stop** EKRRKVEQNPGGNRTNTRAT  
**Stop** WTPTHNPNSKKTKKSGTHPGRHARRPRRTQRKTTKKGQ

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

RTTRRKDRGPVLCILEVTAAGSGFQRP **Stop** IFAG **Stop** CCRN **Stop M** TWRETG  
ERT **M** AAADGYSSRPQEASSRTRPVYQGTIAPAYHAALSSTSKSIAFSRAS  
RAH **M** ALHASSIHESATVGYIQYRRHIAI **Stop** ATPGS **Stop** FRFRGQYIHGVAS  
GLKKSQARQIQVLRISGKRYLQQPPSDNGNTNRYLLAQVIGTLNTI **Stop** AL  
SNKLVDETHEKE **Stop** NPQD TDWTRPTNGDNTGRTNTHKRTKARGETDN  
GHIG **Stop** SGQIRQKT TD **M** GKHTRRGTRPRRKATSEHKPKGAM **P** NTGH **Stop**  
R **Stop** NKTGKQTRRHE **M** DTKREHNERKNARWSKTQEATARTHARHNGHQ  
RITPIVKKPKRAAPTQEGTPGDQEEHKGRPQRKDK

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

GLRGERTGARFYASWKSLLPAQAFRGHEYSRASAAGTR **Stop** LGEKLARG  
LWPPP **M** DTHRDRKRHRHAHVQCIRAP **Stop** HPHT **M** QRYLALARASHFPVH  
RERTWRC **M** PLVY **M** NQRQSATSSTGDISRSKQRLVRDSDSEGNIF **M V Stop**  
LQGSKRARQGKFRCYASLESATCNNHQVT **M** AIQIAISWRK **Stop** SARLTQY  
RHYPTNWL **M** KHTQKRNRTHKTQIGPGPP **M** ETIRAEQIHTKGPKHAARQIT  
DTS DNP **AK Stop** GKQPTWANTQDEGLDQEEKPQANINQKGPCQTQGTRG  
KTKQENKPGGTKWTQRGST **M** REKTQGGAKPRRQPHEHTRDI **M** DTNA **Stop**  
PQ **Stop Stop** KNQKERHPPRKARQETKKNTKEDHKERTK

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

LCPPFFVFLCVLLGLLACLPGWVPLFLVFLLLGLCVGVHYVARVFRVRLPPG  
FCSTLRFFSHCAPSLCPFRASWFVFLFCFTSSALCLAWPLL VYVRLWVLF  
LV **Stop** SLVLCVCPCLFFALFGRIIRCVRYLSRRVLWSFCVYLFPCPYCLHW  
WAWSNLCLVGSIPFLCVFHQPVCWIVPILC **Stop** ACRSLAPGDSLDLYCHCH  
LVVASSAFQRCVTEFALPGSF **Stop** ALKLHHEYIAL **Stop I Stop** ITNQALLRS  
RYVSCTGCSRLSLIHVY **Stop** RHAAPCALA **M** HGK **M** RCSC **Stop C Stop** IALHG **M**  
RVLWCPD TLDVCVT **M** PLAVS **M** SIHRRRP **Stop** SSRQFLSKSSSSSGSTSPRI  
F **M** ASESLSRQQ **Stop** LPGCIKPGPCPFAS **Stop S**

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

FVLSLWSSFFVFLVSWRAFLGGCRSFWFFYYWGYALVSI **M** SRVCSCGCL  
LGFAPPCVFSLIVLPLCVHFVPPGLFSCFVLPVPCVWHGPFWF **M** FACGF  
SSWSSPSSCVFAHVGCFLPYLAGLSDVSVICLAACFGPFVCIC SARIVSIG

GPGPICVLWVLFVCFINQFVG **Stop** CLYCVKRADHLRQEIAICIAIVTW  
WLLQVALSRDA **Stop** HLNLPCLALFEP **Stop** SYT **M** NILPSESESRTTRCLDRD  
**M** SPVLDVADCR **Stop** **F** **M** YTRG **M** QRHVRSRCTGKCDALASAR **Stop** **R** **C** **M** VCG  
CYGALIHWTCA **Stop** RCLLSR **Stop** VSIGGGHSPLASFSPSHLVPAALAREY  
SWPLKA **Stop** AGSSDFQDA **Stop** NRAPVLSRSP

#### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

LSFLCGLPLCSSLWSPGVPSWVGAALFGFFTIGV **M** RWCP LCRACVRAVAS  
WLLHLAFLSLCSLFVVISCLLVCFPVLFYL **Stop** CPVFG **M** APFGLCSLVA  
FLLGLVPRLVCLP **M** SVVFCLIWPDYP **M** CPLSVSPRALVLLCVFVLPVLSPL  
VGLVQSVSCGFYSFSVCVSSTSLLD SAYIVLSVPITCARR **Stop** RFVLPVLSL  
GGCK **Stop** RFPE **M** RNT **Stop** ICRAWLFLSPEATP **Stop** IYCPLNLNHEP GVA  
**Stop** IAICLLYW **M** **Stop** PTVADSCILEACSA **M** CARDARENA **M** LLLVLDSAAWY  
AGAMVP **Stop** YTGVRVDDASCGLDEYP SAAIVLSPVSLQVI **Stop** FRQH **Stop**  
PANIHGL **Stop** KPEPAAVTSR **M** HKTGPLSFRLVVL

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 5.

#### **4.2.3. Fragmento 3 gerado com H1-A:**

##### **4.2.3.1. Sequência refinada:**

5'ATAAAGGCATGGGCGCATGGCCCGGGCCGGGTTTCATGCTCTGCATGTCGTCTGCTGCCCGTCCG  
GTGTTTTCGAGAGCCCATGCCTCTTCGCGGGCTCAGTGCTGCCGTGCCTCGAAGTGGCCCGTCTGGC  
GGAGCCTCGGCGACGCTGCGACAATTGGCGGCCGCGACGAGTTAGCTCCTACACCGAGACCGCCA  
ACGAGGAACGAGCGAAACAACACGAGAAGACGGGCCACAAAACAGAAAACATGCAGGAAATCAAAA  
GACAAGGAAGAGAAAAACCAGAGAAAACAGAGACAAAAGGCAGACAGACCACAGAAAAAAGAAC  
AGAAGAAAAAGAAAAAACAAAAGGAAAAAGAAAAAGACACAGAGCGACAAACTCGAACCAAAAAAC  
GAGGACACAGGAGACAAACAAAAGAACAGCACGACAAAAAACAGAAACCACAACAAGAAAAGAGAAC  
AGAAAAACAAGAACAACAGAAAAAAGAAACAAAGAGCGACCGAGAAACAACAAAAAAGAGCA  
CCAAAACAAGACGAAAAAACA AAAAGAAAAACACAAAAACAAAAAATGACAACCCACAAAGAAAA  
AGAGACGACGAACAAACACAAAAGAACAACCCACGCAAAAAACACAAACAAACAAACGACAAAAGG  
CGAAAAACAAAAGAAAAACGCCACAACAGGAAAAACAAGACACAAAACAAGGAAAAGAACAAAA  
GACAAAACCAACACAAGCCAAAGGAAACAACACAACGCAACCGAGGAACAACAACAAGAAAGCG  
AAAACACAGAACA AAAACAAGAAAAAGAAACAAGAGAAAAAAGAAAAACACAAAGCAAAAAAGAAA  
AGAAACAAGA3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

**Tabela 4.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 1.1 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-A.

Fase de leitura	Identificação	Descrição da proteína	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 2	Swiss-Prot: P40193.1	Proteína reguladora da transcrição ptsJ	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	35.0
5'3' - 3	GenBank: CAO00730.1	Proteína precursora de degradação da celulose	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	36.2
3'5' - 2	YP_003198839.1	Proteína de reparo do DNA	<i>Desulfohalobium retbaense</i>	37.4
	ZP_05475437.1	Proteína hipotética	<i>Enterococcus faecalis</i>	37.0
3'5' - 3	ZP_04455654.1	Proteína hipotética	<i>Shuttleworthia satelles</i>	37.4

**Tabela 5.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 1.2 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-A.

Fase de leitura	Identificação	Descrição da proteína	Organismo fonte	“Score” de similaridade
3'5' - 2	ZP_01160856.1	D-alanina glicina permease	<i>Photobacterium</i> sp.	37.0
	ZP_01235478.1	D-alanina glicina permease	<i>Vibrio angustum</i>	37.0
	ZP_04860252.1	Sódio: proteína da família simportador de alanina	<i>Fusobacterium varium</i>	36.6
	YP_130251.1	Sódio: proteína da família simportador de alanina	<i>Photobacterium profundum</i>	36.2
	ZP_05632900.1	Sódio: proteína da família simportador de alanina	<i>Fusobacterium ulcerans</i>	36.2
	YP_079234.1	Proteína carreadora de aminoácido	<i>Bacillus licheniformis</i>	36.2
3'5' - 3	ZP_04341308.1	Nucleosídeo-difosfato açúcar epimerase	<i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i>	36.6
	Swiss-Prot: Q8DEZ9.2	Histidil-tRNA sintetase	<i>Vibrio vulnifi</i>	33.5
	Swiss-Prot: Q3ICZ6.1	Histidil-tRNA sintetase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	33.5
	Swiss-Prot: Q9KTX0.1	Histidil-tRNA sintetase	<i>Vibrio cholerae</i>	33.5

#### 4.2.3.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da

sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

IKAWAHGPGPGSCSACRLLPRRCFESPCLFAGSVLPCLEVARLAEP R R R C  
DNWRPPTS **Stop** LLHRDRQRGTSETTREDGPNRKHAGNQKDKEEKPEK  
TETKGRQTTEKKEQKKKKKTGKRKKTQSDKLEPKNEDTGDKQRTARQK  
TETTRKEKQKKQEQQKKKKQRATEKQHKRAPKQDEKKQKEKTQKQKM  
TTHKEKRDDEQTQKNKPTQKNTNKQTTKGEKTEKRHRNRKTKTQNKGGK  
HKRQNHKPKETTQRKPRNKQQRKRKHRTKTKKRTREKKRKTQSKKEKK  
Q

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

**Stop** RHGRMARARVHALHVCCPVGVSRHAASSRAQCCRASKWPVWRS  
L GDAATIGRRRVSSYTETANEERAKQHEKTGHKTEN **M** QEIKKTRKRKNQ  
RKQRQKADRPQKKNNRRKRKKQKEKEKRHRATNSNQKTRTQETNKEQH  
DKKQKPQQEKRRNRKNKNNRKKRNKERPRNNTKKEHQNKTKKNKKKKHK  
NKK **Stop** QPTKKKETTNNKHKRTNPRKKTQTNKRQKAKKQKNATTGKQRH  
KTKERNTKDKTNTSQRKQHNANRGTTNNKESENTEQKQRKEQEKKKEKHK  
AKKRNK

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

KG **M** GAWPGPGF **M** LCMSSAAPS VFREP **M** PLRGLSAAVPRSGPSSGGASAT  
LRQLAAADELAPT R P P P T R N E R N N T R R R A T K Q K T C R K S K R Q G R E K T R E N  
RDKRQTDHRKKRTEEKEKNRKKKDDTERQTRTKKRGHRRQTKNSTTKN  
RNHNKKRETEKTRTTEKKTSDRETTQKKSTKTRRKTTRKNTKTKNDN  
PQRKKRRRTNTKEQTHAKKHKQTNDRRKNKRKTPQQENKDTKQRKETQ  
KTKPTQAKGNNTTQTEEQTTKAKTQNKNEKNRKKKKNTKQKRKETR

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

SCFFSFLLCVFLFFSLVLFVFLCFRFLCCLFLGLRCVVSFGLCWFCLLC  
FFPLFCVFLWRFVFFSFPVCLVFFCVGLFFCVCSSSLFSLWVVF  
CFCVFSFCFFSSCFGALFLCCFSVALCFFFCCSCFFCFSFLVVSVFCR  
AVLCLSPVSSFFGSSLSLCVFFLFPVFFFCSFFSVVCLPFVSVFSGFF  
SSLSF **Stop** FPACFLFCGPSSRVVSLVPRWRSRCS **Stop** LVGGRQLSQR  
RSARRATSRHGSTEPAKRHGLSKHRRGSRRHAEHEPGPGCAHAF

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

LVSFLFCVFFFFFLLFFSLFLFCVFAFFVVCSSVCVVLFPACVGFVFCV  
SFLCFVSLFSCCGVFLFRLLSFVCLCFFAWVCSFVVRRLFFLCGLSFF  
VFVFFLVFFRLLVLFVFCVSRSLFVSFFSVLVFSVSLFLLWFLFFVFL  
FVCLLCPRFLVRVCRSVSFFFLLFFSFSSVLFLLWSVCLLSLFLVFLP  
CLDFDLHVFCFVARLLVLFVRSFLVGGVGVANSSAAANCRSVAEAPPDGP  
LRGTAALSPRRG **M** GSRNTDGAADD **M** QS **M** NPGPGHAP **M** PL

##### f) 3'5' fase de leitura 3:

LFLFFFALCFSSFFSFCFLCFCVFSLSLLFVPRFALCCFLWLVLVLSFVFL  
SFVLCCLCFPVVAFFFCFFAFCLFVCFVLRGFVLLCLFVVSFFFVVGCHFLF  
LCFFFLFFFVLFWCSFFVLFGRSLFLFFLLFFLFLFSCCGFCFLSCCSL  
FVSCVLVFWFEFVALCLFSFSCFFLFFLFFFCGLSAFCLCFLWFFLFLV  
FLISC **M** FSVLWPVFSCCFARSSLAVSV **Stop** ELTRRRPPIVAASPRLRQTGH  
FEARQH **Stop** AREEAWALETPTGQQTTCRA **Stop** TRARA **M** RPCLY

Nenhuma das sequências de aminoácidos geradas pelo fragmento 3 apresentou similaridade significativa com proteínas descritas e disponíveis nos bancos de dados consultados.

#### 4.2.4. Fragmento 4 gerado com H1-G:

##### 4.2.4.1. Sequência refinada:

```
5'CTGGTCCCACATGTCCCACCCCGGTGGGTTTTTCTGCTCCTGTCCGGTGTGCGGTTAGCAGTCTTC
CTTACCCCTGTTGCGGTCCGCACGCGGTCTGTGTCTCCCACGTCCCTGTGGCCATTTGCGCGCTCA
CATCGGGAGCGCATCTGCTTGGGACCTGGACCTTGCACTGCGGCTCGCTCAGGAATCTTGAATCTTT
TGGCCCGGGTGTACAATCCCGAGTTTCCGATAATGAACACTGTGAGAAGAAATGAGCCCAGGATCAC
ATGATCATCAACGCCTTTATACTCGGTTTACAAATAGTGGAATTCAACATTGATGAATATGATACGAGT
ATTGAAAGTTCTCAAACGGACAACCTGTAATATTGGATCCAATTATGTACACTATGTAACAAAGACA
TGACATGTAAATAAAAAGAATAAGTGATACGCACACTTATTAATAAATGGAATTATTTTCATACAAGGA
TGGCGGACTAGCAATTTAATGGAGTGGAATCAATAATTGGCCCACCACCAAGGAAAAATGTCACCAAC
AATCAATGAAAATTAAGTTTCAGAGGACAATAACCTGCAAAAAATGAAATCCCATTGAGGTGACAGCAC
TTAATTCTATCAAACCACGAAAACCTACCCATTGGAGCAGCCCTGCGGCCGTAACAATTGAAAAAGGCA
AAAGAGGGTGAACCAATAACCACAATGAACCCAGTAGGAGAACAATCAAGTATACACTACGTCAATG
GAAGCTTTCGTAGGCACAGCAATCAAACAAACAACATTCAAATTAACCTCTTTACGAGACCAATGTAAC
GCCAATATAAACCAAATTGAAGTTAACAACGTAA3'
```

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.4.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

```
SGPTCPTPVGFFCSCRCVAVSSLPYPCCGPHAVCVSHVPVAISPRHIGSAS
AWDLDLALRLAQES Stop IFWPGCTIP SFR Stop Stop TL Stop EE M SPGSHDHQ
RLYTRFTNSGIQH Stop Stop I Stop YEY Stop KFSKRTTL Stop YWIQLCTLCNKD
M TCK Stop KE Stop VIRT LINKWKLFSYKDGGLAI Stop WSGINNWPTTKEKCH
QSS M KIKVQRTITCKK Stop NPIQVTALNSIKPRKLPIGAALRP Stop QLKKAK
EGEPITTM NPVGEQIKYTLRQWKLS Stop AQQSNKQHSN Stop PLYETNVTP I
Stop TKLKLTT Stop
```

###### b) 5'3' fase de leitura 2:

```
LVPHVPPRWVFSAPVGVRLAVFLTPVAVRTRSVSPTSLWPFRRVTS GAHL
LGTWTLHCGSLRNLESFGPGVQSRVSDNEHCEKK Stop AQDH M IINAFILG
LQIVEFNIDEYDTSIESSQNGQLCNIGSNYVHYVTKT Stop HVNKKNK Stop Y
AHLINGNYFHTR M AD Stop QFNQGVESIIGPPPRKNVTNNQ Stop KLFKFRGQ
Stop PAKNEIPFR Stop QHLILSNHENYPLEQPCGRNN Stop KRQKRVNQ Stop P
Q Stop TQ Stop ENKSSIHVNGSFRRHNSNQTNNIQINLFTRP M Stop RQYKPN
Stop S Stop QR
```

### c) 5'3' fase de leitura 3:

WSH **M** SHPGGFFLLLSVCG **Stop** QSSLPLLRSARGLCLPRPCGHFAASHRE  
RICLGP GPCTAARSGILNLLARVYNPEFPI **M** NTVRRNEPRIT **Stop** SSTPLYS  
VYK **Stop** WNSTL **M** N **M** IRVLKVLKTDNSVILDPI **M** YT **M** **Stop** QRHD **M** **Stop** IKRIS  
DHTY **Stop** **Stop** **M** EIIIFIQGWRTSNL **M** EWNQ **Stop** LAHHQ GK **M** SPTINEN **Stop**  
SSEDNNLQK **M** KSHSGDST **Stop** FYQTTKTHWSSPAAVTIEKGKRG **Stop** TN  
NHNEPSRRTNQVYTT **S** M EAFVGTAIKQTTFKLTSLRDQC NANINQIEVNN  
V

### d) 3'5' fase de leitura 1:

LRC **Stop** LQFGLYWRYIGLVKRLI **Stop** **M** L F V **Stop** LLCLRKLPLT **Stop** CILD LFS  
YVWHCGYWFTLFCLFQLLRPQGCSNG **Stop** FSWFDRIKCCHLNGISFFAGY  
CPLNFNFH **Stop** LLVTFFLGGGPIIDSTPLNC **Stop** SAILV **Stop** K **Stop** FPFINKC  
AYHLFFLFTCHVFVT **Stop** CT **Stop** LDPI LQSCPF **Stop** ELSILVSYSS **M** LNSTIC  
KPSIKAL **M** **I** **M** **Stop** SWAHFFSQCSLSETRDCTPGPKDSRFLSEPQCKVQVP  
SRCAPDVTRRNGHRDVGDTDRVRTATGVRKTANRTPTGA EKTHRGGTC  
GTR

### e) 3'5' fase de leitura 2:

YVVNFNLVYIGVTLVS **Stop** RG **Stop** FECCLFDCCAYESFH **Stop** RSVYLICSP  
GFIVVIGSPSFAFFNCYGRRAP **M** GSFRGLIELSAVT **Stop** **M** GFHFLQVIVL  
**Stop** TLIFIDCW **Stop** HFSLVVGQLLIPLH **Stop** IASPPSLYENNFHLLISVRITYS  
FYLHV **M** SLLHSVHNWIQYYRVRFENFQYSYHIHQ C **Stop** IPLFVN RV **Stop** R  
R **Stop** **Stop** SCDPGLISSHSVHYRKL GIVHPGQKIQDS **Stop** ASRSARSRSQAD  
ALP **M** **Stop** RGE **M** ATGTWETQTACGPQQG **Stop** GRLLTAHRQE QKKPTGVGH  
VGP

### f) 3'5' fase de leitura 3:

TLTTSIWFILALHWSRKEVNLNVVCLIAVPTKASIDVVYT **Stop** FVLLLGS L W  
LLVHPLLPSIVTAAGLLQWVVFVV **Stop** **Stop** N **Stop** VLSPEWDFIFCRLLSSE  
L **Stop** FSLIVGDIFPWWWANY **Stop** FHSIKLLVRHPC **M** KIISIY **Stop** **Stop** VCVSL  
ILFIY **M** SCLCYIVYIIGSNITELSLRFTFNTRIIIFINVEFH YL **Stop** TEYKGVDD  
HVILGSFLLTVFIIGNSGLYTRAKRFKIPERA AVQGP GP KQ **M** RSRCDAAK  
WPQGRGRHRPRADRNRGKEDC **Stop** PHTDRSRKNPPGWD **M** W D Q

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 6.

## 4.2.5. Fragmento 8 gerado com H1-G:

### 4.2.5.1. Sequência refinada:

5'CCGGGCGTGGGTGGATTGCCCCCTTTGGTGGTTTTATAGCAGCGAGCTGGTTTTGCCGGTGCCCT  
GCAGGCTTCTGTTGCTTCTCCCGTCGTCATTGGTTAGCTCCTTCTGTTTGCTGAGTCGCGCCACGTGA  
CCGTCCC GGA ACTGGGTGGCGTTTTTCCGTTTCATCTGTGTCCAGGCAGTTGGTGCCGTGTGTGCTG  
CGTGCCCTCTAGCAACAAAGTCGGCTGCGGTA CTGTGTGGATTGCGTACCGTCTACGCCGTCTGTC  
TGTCATTTTAATTGCGCTACAAACAAGGTGACTGAGTGTTACACGAACAGGCTCAATAAAAGAAGACA  
AGTTTCGGGTCTCTAGGAACGCTCAGTGATTGTACCGTCTCGCCGACACACGACTAGAGCAGTTATC  
CCACGGGCCACTTACTACTTAGGAGTTCGTAGTCCATATTGTTTTGAATCCCCTGACCCGTTACGC  
GGATACCCTTGACGATTC AATAATAGGGGGGGTGTGTGTAGAGCATAGTCCCTTAGTGAACAGAATG  
TTAGAAAGGCAAAGCATCCGATCATCCTTTG3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### 4.2.5.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

PGVGG LPPFGGFIAASWFCRCPAGFCCFSRRHWLAPSV C **Stop** VAPRDRP  
GTGWRFSVSSVSRQLVPCVLRCP LATSAAVLCGLRTVYAVCLSF **Stop** LR  
YKQGD **Stop** VLHEQAQ **Stop** KKT SFGSLGTLSDCTVSP THD **Stop** SSYPTGHLL  
LRSS **Stop** SILF **Stop** I PLAPLRGYP **Stop** RFNNRGGLL **Stop** SIVP **Stop** **Stop** TEC  
**Stop** KGKASDHPL

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

RAWVDCPPLVVL **Stop** QRAGFAGALQASVASPVVIG **Stop** LLLFAESRHVTVP  
ELGGVFPFHLCPG SWCRVCCAAL **Stop** QQSRLRYCVDCVPSTPSVCHFNC  
ATNKVTECYTNRLNKRRQVSGL **Stop** ERSVIVPSRRHTTRAVIPRATYYLGV  
RSPYCFESHWHRYADTLDDSIIGGGCCRA **Stop** SLSEQNVRKAKHPIL

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

GRGWIAPLWWFYSSSELVLPVPCRL LLLLLPSSLVSSFCLLSRAT **Stop** PSRN  
WVAFFRFICVQAVGAVCAALPSSNKVGC GTVWIA YRLRRLSVILIALQTR  
**Stop** LSVTRTGSIKEDKFRVSRNAQ **Stop** LYRLADTRLEQLSHGPLTT **Stop** EF  
VVHIVLNPTGTVTRIPLTIQ **Stop** **Stop** GGVVVEHSPLVNR **M** LERQSIRSSF

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

QR **M**IGCFAFLTFCSLRDYALQQPPPIESSRVSA **Stop** RCQWDSKQYGLRT  
PK **Stop** **Stop** VARGITALVVCRRDGTITERS **Stop** RPETCLLLLSLFV **Stop** HSVTL  
FVAQLK **Stop** QTDGVDGTQSTQYRSRLCC **Stop** RAAQHTRHQLPGHR **Stop** NG  
KTPPSSGTVTWRDSANRRS **Stop** P **M**TTGEATEACRAPAKPARCYKTTKGG  
QSTHAR

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

KG **Stop** SDALPF **Stop** HSVH **Stop** GT **M**LYNNP LLLNRQGYPRNGASGIQNN **M**  
DYELLSSKWPVG **Stop** LL **Stop** SCVGETVQSLSVPRDPKLVFFY **Stop** ACSCNT  
QSPCL **Stop** RN **Stop** NDRQTA **Stop** TVRNPHSTAADFVARGQRSTHGTNCLDT  
DETEKRHPVPGRSRGATQQTEGANQ **Stop** RREKQKPA GHRQNQLAAIKP  
PKGGNPPTP

##### f) 3'5' fase de leitura 3:

KDDR **M**LCLSNILFTKGLCSTTTPPY **Stop** IVKGIRVTVPVGFKTIWTTNS  
**Stop** VVSGPWDNCSSRV SARRYNH **Stop** AFLETRNLSSFIEPVRVTLSHLVCS  
AIK **M**TD RRRRRYAIHTVPQPTLLLEGSAAHTAPTAWTQ **M**KRKNATQFRDG  
HVARLSKQKELTND DGRSNRSLQGTGKTSSLL **Stop** NHQRGAIHPRP

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 7.

#### 4.2.6. Fragmento 9 gerado com H1-G:

##### 4.2.6.1. Sequência refinada:

```
5'AGTCCCCGCGGGGGGGGGTATTTTAGCTGAGAGCAACCAGCGAGAGAGGGAACAAACACAAACC  
CCCCAAGGGGGAGGGGTTTTTTAAGAAAAAGACAAAAGAAAGAGAAGAGACACAACAGAGATACG  
AGAAACAGCCACAGACAAAACCTGAAAAGCAAGAGAAGAAACACAAAAAAAAGAGAACAGCACAGAA  
GCAAGAAAAAAGCAAAGAAAACACAATGAAAACGACCACGGGAAGGGGAGGAAACATCCAAACGAA  
CACCAAGCATGGGAAACAGAACACCCACAAAGATACAAGGCAGGTCAAACCGAAAGATCCGCGAAGC  
ACCACAAGACCAACCAAGAAGCCGGCGCCACAAAGAGAAGGGCGGGAACCAAATAAGCGAGAAAG  
CCAAAAAAGCCACCAGAAAACAACCAGACACCACGAAAAACCAAACCCAGGAAGAAAACACACAAA  
GCACCAGCGAAAACAACCAGACACCACGAAAAACCAAACCCAGGAAGAAAACACACAAAGCACCAGC  
G3'
```

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.6.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

```
KSPRGGVILAESNQREREQTQTPPRGRGFFKKKTKEREETQQRYEKQPQ  
TKLKSKRRNTKKKRTAQQKEKKQRKHNGNDHGKGRKHPNEHQAWETEH  
PQRYKAGQTERSAKHHKTNQEAGATKRRAGTKISEKAKKSHQKTTRHHE  
KPNPGRKHTKHQRKQPDTTKNQTQEENTQSTS
```

###### b) 5'3' fase de leitura 2:

```
SPRGGGLF Stop LRATSERGNKHKPPQGGGVFLRKRQKKEKRHNRDTRNS  
HRQN Stop KAREETQKKREQHRSKKKSKENT METTTGRGGNIQTNTKHGK  
QNTHKDTRQVKPKDPRSTTRPTKKPAPQREGREP Stop ARKPKKATRKQ  
PDTTKNQTQEENTQSTSENNQTPRKTTPRKKTHKAPA
```

###### c) 5'3' fase de leitura 3:

```
VPAGGGYFS Stop EQPAREGTNTNPPKGEGFF Stop EKDKRKRRTTEIRET  
ATDKTEKQEKKHKKKENSTEARKKAKKTQWKRPREGEETSKRTPS MGNR  
TPTKIQGRSNRKIREAPQDQPRSRRHKEKGGNQNKRESQKKPPENNQTP  
RKTKPRKKTHKAPAKTTRHHEKPNPGRKHTKHQ
```

###### d) 3'5' fase de leitura 1:

```
RWCFVCFLPGFGFSWCLVVFAGALCVFFLGLVFRGVWLFSGGFFWLSRL  
FWFPPFSLWRLLGWSCGASRIFRFDLPCIFVGVLF MLGVRLDVSSPSR
```



GRFHCVFFAFFLASVLFSSFFLCFFSCFSVLSVAVSRISVVSLFLLSFS **Stop**  
KNPSPLGGFVFPVPSLAGCSQLK **Stop** PPPAGT

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

AGALCVFFLGLVFRGVWLFSLVLCVFSSWVWFFVVSVCFLVAFFGFLAYF  
GSRPSLCGAGFLVGLVLRGVSFGLTCLVSLWVFCFPCLVFVW **M**FPPLPVV  
VSIVFSLLFFLLCCSLFFCVSSLAFAQFCLWLFLVSLCLFSFFCLFLKKT  
PPWGGCLFLPLSLVALS **Stop** NNPPRGL

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

LVLVCFSSWVWFFVVSVCFRWCFVCFPLPGFGFSWCLVFWLFLAFSLI  
LVPALLFVAPASWLVLWCFADLSV **Stop** PALYLCGCSVSHAWCSFGCFLPF  
PWSFPLCFLCFFSCFCVAVLFFFVFLLLFSFVCGCFSYLCCVSSLSFVFFL  
KKPLPLGGVVCVCSLSRWLLSAKITPPRGD

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 8.

**4.2.7. Fragmento 4 gerado com H1-C:**

**4.2.7.1. Sequência refinada:**

5'GGAGGAGAAACCCCGTCGAAGTTTCGCCATCATGACTCATCCGGCGCGCAAAGGCCTCTCGTAATT  
ATCCGCCTCGACCCTCATTCTGCCGATTCAGCGACAGAGTGAGTAACCCAACCTTTATCGGACGATAG  
TGCACGCTCCTATCGGAGACCGTGACAGATAGGCGCNCGCATCGACTTTCCACTGCGGCCCGTGCG  
AAGTGCAAGGGGCATAGCGCTATTCTAGGCTACGCACGTGATAGACCGCGTCCCGATGACTTCGCA  
ATGCTGACGAATCATCGAGCAGACCCTACTACAGAGCTGTCTCTACCGACCGGCAGACGCCGCGGC  
GTCTCGAATCGAGTGGCTCAGGCACATTCCCCTCTGGCTGTGTCGAGTACGCGGCCATAATTCAT  
TCGACGAGCCGCCAGTGGCCGAGCGACAGCTGAAGGGGTGGGATAGATATTAACCAACTGCTTCATT  
AACGCCTCGCGTACTAGTGTGTACGGGGTTGCCACGAATATCACTACGTTTTTGTACTACTTGCTC  
GAGTGCAGCCTGCGCTGGAGACAGGATAACGAGTGAATATCGTGGACACCTCGTTGACAGACTCA  
GTACGAGCGTAAATCAAGGAGTCTGCGTTACAATATCTCTATCCAGCCCGTTCAACTTTGGCTCGGGC  
ACTGGCGGCTGTGATTGATTGATTGCGCGCGTGTCTCGGACGACGAGGCGAAGGACCGGAAATTT  
CGTGCCGACATGTTATCGAAGTCGCCGCGCGGCGATCCCCTTTTGAAGAGCAACTCCGACATTGCT  
CGCCGATTAGTATCCTCGAAACTGCACATTGCCTGGCGGGTATCCCTCGAGCATTAGTGCAGGTTT  
CCGGAATTAGCTTTTGGCCGGCCAGTGTAACGAATTCATCCGGGGCCGGCCTTGTTACGCAATC  
ACATAATCGCCGTAGTCATCGGACTAGGTATCTTGACCACCTTGCCAGGTAAAACCTGAATAG3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

**Tabela 6.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 4 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-G.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 3	ZP_03127434.1	Antranilato sintase, componente amidotransferase	<i>Chthoniobacter flavus</i>	37.0
	YP_063114.1	Proteína hipotética	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	36.6
	ZP_05292354.1	Antranilato sintase, componente amidotransferase	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	36.2
	Swiss-Prot: P05379.1	Antranilato sintase componente II, glutamina amidotransferase	<i>Thermus thermophilus</i>	33.1
3'5' - 1	GenBank: BAD86832.1	Agarase	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	33.1
3'5' - 2	YP_002509165.1	Peptidoglicano glicosiltransferase	<i>Halothermothrix orenii</i>	35.8
	ZP_05313071.1	Antígeno de superfície	<i>Geobacter</i> sp.	35.8
3'5' - 3	YP_001020495.1	Acetil-CoA dehidrogenase oxiredutase	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	36.2

**Tabela 7.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 8 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-G.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 2	YP_003103509.1	DEAD/DEAH box helicase	<i>Actinosynnema mirum</i>	36.2
	ZP_05966209.1	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferase	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	35.0
	YP_001213297.1	ATP sintetase	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	34.7
	YP_002537334.1	Proteína da família aldolase/aldolase classe II	<i>Geobacter</i> sp.	34.7
	YP_003111102.1	MMPL proteína	<i>Catenulispora acidiphila</i>	34.3
	Swiss-Prot: Q2RIL2.1	UPF0597 proteína Moth_1414	<i>Moorella thermoacetica</i>	30.4
5'3' - 3	ZP_05010096.1	Coproporfirinogênio oxidase III	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	35.8
3'5' - 1	YP_002754700.1	NADP oxidoreductase, coenzima F420-dependente	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	34.3
3'5' - 2	Swiss-Prot: Q8NS93.1	UPF0182 proteína Cgl0786/cg0896	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	30.8
3'5' - 3	YP_001889335.1	Diguanilato ciclase / fosfodiesterase com sensor (s) PAS/PAC	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	35.0

#### 4.2.7.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da

sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

GRRNPVEVSPS **Stop** LIRRAKASRNYP RPSFCRFS DRVSNPTLIGR **Stop** CT  
LLSETVTD RRRXHLSTAARAKCKGHSAILGYARDRPRPR **Stop** LRNADESS  
SRPYYRAVSTDRQTPRRLESSGSGTFPPLAVSSTRP **Stop** FIRRAASGRAT  
AEGVG **Stop** ILTNCFINASRTSAVTGLPRISLRFCTTCSSAACAGDRITSEYR  
GHLVDRHSVRA **Stop** IKESALQYLYPARSTLARALAAVD **Stop** F M ARVSRTR  
RRTGNFVPTCYRSRRAAIPF **Stop** KSNSDIARRLVSSKLHIAWRVIPRALVR  
VPGISFWPAQCKRIHPGALFTQSHNRRSHRTRYLDHLAR **Stop** N **Stop** I

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

GGETPSKFRHHDSSGAQRPLVIIRLDPHSADSATE **Stop** VTQLLSDDARS  
YRRP **Stop** QIGXRIDFPLRPVRSARGIALF **Stop** ATHVIDRVPDDFA M LTNHR  
ADPTTELSLPTGRRRGVSNRVAQAHSRLWLCRVRGHNSFDEPPVAERQL  
KGWDYR **Stop** PTASLTPrVLVLSRGCHEYHYV FVLLARVQPALETG **Stop** RV  
NIVDTSLTDTQYERKSRSLRYNISIQPVQLWLGHWRLSIDSWRACLGRRG  
EGPEISCRHVIEVAARRSRFRATPTLLAD **Stop** YPRNCTLP GGS SLEH **Stop**  
CAFPELAFGRPSVNEFIRGRPCSRNHIIAVVIGLILTTLP GKTE **Stop**

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

E EKPRRSFAI M THPARKGLS **Stop** LSASTLILPIQRQSE **Stop** PNSYRTIVHAP  
IGDRDR **Stop** AXASTFHCGPCEVQGA **Stop** RYSRLRT **Stop** **Stop** TASP M TSQC  
**Stop** RIIEQTL LQSCLYRPADAAASRIE WLRHIPASGCVEYAAIIHSTSRQWP  
SDS **Stop** RGGIDINQLLH **Stop** RLAY **Stop** CCHGVATNITTFLYLLECSLRWRQ  
DNE **Stop** ISWTPR **Stop** QTLSTSVNQGVCVTISLSSPFNFGSGTGGCRLIHGA  
RVSDDEAKDRKFRAD M LSKSPRGDPVLEEQLRHCSPI SILETAHCLAGHP  
SSISARSRN **Stop** LLAGPV **Stop** TNSSGAGLVHAIT **Stop** SP **Stop** SSD **Stop** VS **Stop**  
PPCQVKN

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

LFSFTWQGGQDT **Stop** SDDYGDYVIA **Stop** TRPAPDEFVYTGPAKS **Stop** FRE  
RAL M LEG **Stop** PARQCAVSRILIGEQCRCSSKTGSPRGDFDN M SARNFRS  
FASSETRAP **Stop** INRQPPVPEPKLNGLD RDIVTQTP **Stop** FTLVLSVCQRG  
VHDIHSL SCLQRRLHSSK **Stop** YKNVVIFVATP **Stop** QH **Stop** YARR **Stop** **Stop** SS  
WLISIPPLQLSLGHWR LVE **Stop** I M AAYSTQPEAG M CLSHSIRDAAASAGR  
**Stop** RQLCSRVC S MIRQHCEVIGDAVYHVRSLE **Stop** RYAPCTSHGPQWKVD  
AXAYLSRSPIGACTIVR **Stop** ELGYS LCR **Stop** IGR M RVEADNYERPLRAG  
**Stop** V M MAKLRRGFSS

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

YSVLP GKVV KIPSP M TTAI M **Stop** LREQGRPR M NSFTLGRPKANSNAH  
**Stop** CSRDDPPGNVQFRGY **Stop** SASNVGVALLKRDRRAATSITCRHEISGP  
SPRRPRHARHESIDSRQCPSQS **Stop** TGWIEIL **Stop** RRLDLRSY **Stop** VSVN  
EVSTIFTRYPVSSAGCTRASSTKT **Stop** **Stop** YSWQPRDSTSTRGVNEAVG  
**Stop** YLSHPFSCR SATGGSSNELWPRTRHSQRRECA **Stop** ATRFETPRRLPV  
GRDSSVGSAR **Stop** FVSI AKSSGTR SITCVA **Stop** NSAM PLALRTGRSGKS  
M XAPICHGLR **Stop** ERALSSDKSWTHSVAESAE **Stop** GSRRITRGLCAPDE  
S **Stop** WRNFDGVSP

##### f) 3'5' fase de leitura 3:

IQFYLARWSRYLVR **Stop** LRRLC DCVNKAGPG **Stop** IRLHWAGQKLIPGTRTN  
ARG M TRQAM CSFEDTNRRAM SELLF **Stop** NGIAARRLR **Stop** HVGTKFPVLR

LVVRDTRAMNQSTAASARAKVERAG **Stop** RYCNADSLIYARTECLSTRCP  
 YSLVILSPAQAALQVQKRSDIRGNPVTALVREAL **M** KQLVNIYPTPSAVA  
 RPLAARR **M** NYGRVLDTARGGNVPEPLDSRRRGVCRSVETAL **Stop Stop** GLL  
 DDSSALRSHRGRGLSRA **Stop** PRIALCPLHFARAAVESRCXRLSVTVSDRS  
 VHYRPIRVGLLTLNLNRQNEGRGG **Stop** LREAFARR **M** SHDGETSTGFL

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 9.

#### 4.2.8. Fragmento 7 gerado com H1-C:

##### 4.2.8.1. Sequência refinada:

5'GTTCCGGGCGGACCCGCGCCTGCGTGGTCTTTTTATCGAACGCGACGTTGTACGCGCGCCTTG  
 CTCGTGGCTAACCGGCCACCGTACGTCTGTAGTGTGCTGTCTTTGGGCGGGGCGGATCGACGCCTT  
 GTTCGTTCCGCGCGTGTCTCGTCCACTGGTCGCCGATATCCCCTCGTGTGCGCGACACGCGT  
 CGTCCCGGGTCCGCGTGCCTTTGCATATTGGCGCTGTACGTGCGTGTGTGTGCGCTTGAGCTGC  
 TCGACGTTGCCGCGCCTTTTATACTTCTGGACCTTTTGACCTTCCATACCTTGCCGGGGTTCGTCCC  
 CTTATTGGGCGACTGGCTATCCACCTTATGATCGGTCCACCCTGGGGACCCCGCGGACTCTGAGTGG  
 GACGCAGCATTATTCAACAATTGCGAATAGTTACATACGTGAAACCTATTGTACAGAAATACCGTAAAG  
 GGTAATTGTAGAACGAACCAATCAAAATATTGACAGCAAACGGTTACTAATTGGAGCCAGATACTACA  
 CGGTTGTATAACGAGCAGGGAACGAAAAAGATATAAGAGGCAAGACCACAGAACAATAGGGACAAT  
 GTGAATTAGCAAAAACTACGGGAGAAAAATATCAAAAGGAGGAACAGAAGCAACAATTATAGAAAC  
 AGAAGAAAAAAGTGGTGCCTA3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.8.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

RSGRTRACVVFLSNATLSRRALLVANRPPYVCSVVSLGGADRRLVRS  
 PRA LVHWSPDIPLVLP RHASSRVA CLCILA LYVAACVCA **Stop** AARRCRAFYTSG  
 PFDLPYLAGVRPPYWATGYPPYDRSTLGTPTLSGTQHYSTIANSYIRET  
 YCTEIP **Stop** RVIVERTNQNIDSKTVTNWSQILHGCITSRERKRYKRQDHRT  
 N R D N V N **Stop** Q K T T G E N I S K G G T E A T I I E T E E K S G A L

**Tabela 8.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 9 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-G.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
3'5' - 1	ZP_06292266.1	Proteína hipotética	<i>Burkholderia</i> sp.	37.7
	YP_002426815.1	Hidrogenase, subunidade citocromo tipo-b	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	34.3
3'5' - 2	YP_943609.1	Sulfatase	<i>Psychromonas ingrahamii</i>	37.0
	ZP_03658742.1	Proteína hipotética	<i>Helicobacter cinaedi</i>	35.0
	NP_878677.1	Proteína de divisão celular FtsK	<i>Candidatus Blochmannia floridanus</i>	34.7
	ZP_03779845.1	Proteína hipotética	<i>Clostridium hylemonae</i>	34.7

**Tabela 9.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 4 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 3	ZP_01463410.1	Proteína domínio quinase	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	35.8
	Swiss-Prot: A8M4B3.1	Alanina racemase	<i>Salinispora arenicola</i>	32.0
3'5' - 1	PDB: 3I8BA	Cadeia A, estrutura cristalina da xilulose quinase	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	37.7
	ZP_02028274.1	Proteína hipotética	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	37.0
	YP_909295.1	Xilulose quinase	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	36.8
	Swiss-Prot: P05338.1	Ativação da biossíntese de ácido colânico capsular proteína A	<i>Klebsiella aerogenes</i>	33.1
3'5' - 2	ZP_06276767.1	Fator de coagulação tipo 5/8	<i>Streptomyces</i> sp.	35.8
	YP_001828234.1	Proteína hipotética	<i>Streptomyces</i> sp.	35.8
3'5' - 3	YP_001504079.1	Glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase	<i>Shewanella pealeana</i>	36.6
	Swiss-Prot: A8AX77.1	Gama glutamilsfosfato redutase	<i>Streptococcus gordonii</i>	32.0

### **b) 5'3' fase de leitura 2:**

VPGGPAPAWSFYRTRRCHAAPCSWLTGHRTSVVSCPWAGRIDALFVRRV  
LSSTGRPIFPSCCRDTRRPGSRAFAYWRCTSLRVCALELLDVAAPFILLDL  
LTFHTLPGFVPLIGRLAIHLMIGPPWGRGL **Stop** VGRSIIQQLRIVTYVKPI  
VQKYRKG **Stop** L **Stop** NEPIKILTAKRLLIGARYYTVV **Stop** RAGNEKDIRGKTT  
EQIGT **M** **Stop** ISKKLREKIYQKEEQKQQL **Stop** KQKKKVVH

### **c) 5'3' fase de leitura 3:**

FRADPRLRGLFIERDVVTPRLARG **Stop** PATVRL **Stop** CRVLGRGGSTPCSF  
ACSRPLVARYSPRAAATRVVPGRVPLHIGAVRRCVVCVRLSCSTLPRLLYF  
WTF **Stop** PSIPCRGSSPLLGDWLSTL **Stop** SVHPGDPADSEWDAALFNCE  
**Stop** LHT **Stop** NLLYRNTVKGNCRTNQSKY **Stop** QQNGY **Stop** LEPDTRRLYNEQ  
GTKKI **Stop** EARPQNK **Stop** GQCELAKNYGRKYIKRRNRSNNYRNRKWKCT

### **d) 3'5' fase de leitura 1:**

**Stop** CTTFFFCFYNCCFCSSF **Stop** YIFSRSFLLIHIVPICSVVPLISFSFPAR  
YTTV **Stop** YLAPISNRFVAVNILIGSFYNYPLRYFCTIGFTYVTIRNC **Stop** I **M** LR  
PTQSPRGPQGPIIRWIASRPIRGTNPGKVKVKRSRSIKGAATSSSSA  
HTRSDVQRQYAKARDPGRVSRQHEGNIGRPVDESTRRTNKASIRPAQG  
HDTTDVRWPVSHEQGAA **Stop** QRRVR **Stop** KDHAGAGPPGT

### **e) 3'5' fase de leitura 2:**

SAPLFSSVSIIVASVPPFDIFSPVVFC **Stop** FTLSLFVLWSCLLYLFRSLLVIQ  
PCSIWLQLVTVLLSIF **Stop** LVRSTITLYGISVQ **Stop** VSR **M** **Stop** LFAIVE **Stop** C  
CVPLRVRGVPRVDRS **Stop** GG **Stop** PVAQ **Stop** GGRTPARYGRSKGPEV **Stop** K  
ARQRRAAQAHTHAATYSAN **M** QRHATRDDACRGSTRGISGDQWTRARGE  
RTRRRSAPPKDTTLQTYGGRLATSKARRDNVAFDKKTTQARVRPE

### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

VHHFLLFL **Stop** LLLLFLLLIYFLP **Stop** FFANSHCPYLFGLASYIFFVPCSL  
YNRVVSNS **Stop** **Stop** PFCCQYFDWFLQLPFTVFLYNRHFVVCNYSQLLNN  
AASHSESAGSPGWTDHKVDSQSPNKGDEPRQG **M** EGQKVQKYKRRGNVE  
QLKRTHTRRTAPICKGTRPGTTRVAAARGEYRATSGREHAANEQGVDP  
PRPRTRHYRRTVAG **Stop** PRARRGVTTSSRSIKRPRRRGSARN

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 10.

## **4.2.9. Fragmento 8 gerado com H1-C:**

### **4.2.9.1. Sequência refinada:**

5'AAGCCGACGCCACACCACCCAGCAACACCACCGGGAACCGACGCCACCAGCGCAGACCGCCCA  
CCACCAGCGCCCCACGCCTCACCGAGACAGACAGCAAAGCGACAGACAGCGGCGAAGTCCCGC  
CGAGCGGACAGCACCCGGGAAGCAGAAGAGGACAGCACAGCCGAAACACCACGACCCAAAGGGGA  
ACGACAAAGGACGGGGGCGGGAGAGGGGAGAAAAGGGGAGACCACGAGAAAAGCCAGACCAAACAG  
AACAAACACAACAAGAATAACTCCGCTACAACACAAGATGAAAGAACTAACAAAGTAAGACACGAGCTC  
GCACACACACGTACGCACCAGCGGGAGGATGGACGACACTAACAAAGCAAAGGCTAGATAGAAGAAAA

CCGCAAGACGGACACCGCTAATATAGACGACCGTAGGGCAGAGCTTCATTGTACACGCTAACTGAC  
GACCAAACAAACGCCGACGGCAAACAGTCACATGAAGGTCAAGATAGATAGTCACGCACAGCAACTC  
CGCTGACTGCATAACAAGACCCCATCCAGGGTTTTTAAAAGCGGAATCAGTAGCGACAGACAGGGTA  
AGGCCCCCAAT3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### 4.2.9.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

KADATPPQQHHREPTPPAQTAAHHQRPTPHRDRHSKATDRRRSPRERTAP  
GKQKRTAQPKHHDPKGNKGRGRERGERKGRPRESQTKQNKHNKNNSAT  
TQDERTNK **Stop** DTSSHTHVRTSGR **M**DDTNKQRLDRRKPQDGHR **Stop** YRR  
P **Stop** GRASLSHAN **Stop** RPNKRRRQTVT **Stop** RSR **Stop** IVTHSNSADCITRPH  
PGFLKAESVATDRVRPPN

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

KPTPHHPSNTTGNRRHQRRPPTTSAPRLTETDTAKRQTDGEVRASGQHP  
GSRRGQHSRNTTQRGTTKDGGRGERKRGDHEKARNRNTTTRITPLQH  
K **M** KELTSKTRARTHTYAPAGGWTTLTSKG **Stop** IEENRKTDANIDDRRAE  
LHCHTLTDDQTNADGKQSHEGQDR **Stop** SRTATPLTA **Stop** QDPIQGF **Stop** K  
RNQ **Stop** RQTG **Stop** GPP

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

SRRHTTPATPPGTDATSADRPAPHASPRQTQQSDRQTAKSARADSTR  
EAEEDSTAETPRPKGERQRTGAGEGRKGETTRKPDQTEQTQQE **Stop** LRY  
NTR **Stop** KN **Stop** QVRHELATRTHQREDGRH **Stop** QAKAR **Stop** KKTARRTPLI  
**Stop** TTVGQSFIVTR **Stop** LTTKQTPTANSH **M** KVKIDSHAQQLR **Stop** LHNKTP  
SRVFKSGISSDRQGKAPQ

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

IGGPYPVCRY **Stop** FRF **Stop** KPW **M** GSCYAVSGVAVRDYLS **Stop** PSCDCLPS  
AFVWSSVSV **Stop** Q **Stop** SSALRSSILAVSVLRFSSI **Stop** PLLVSVVHPPAGAY  
VCVRARVLLVSSFILCCSGVILVVFVLFGLAFSWSPLFSPLPPPSFVVPLW  
VVVFRLLCPLLLPGCCPLARTSPSVCRFAVSVSVRRGALVVGGLRWRR  
FPVVLLGWCGVGF

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

LGGLTLSVATDSAFKNPGWGLV **M** QSAELLCVTIYLDLHVTVCRRRLFGRQ  
LACDNEALPYGRLY **Stop** RCPSCGFLSSLCLLVSSILPLVRTCVCELVSYL  
LVLSSCVVAELFLLCLFCLVWLSRGLPFSPLSRPRPLSFPFGSWCFGCAV  
LFCFPGAVRSRGLRRLSVALLCLSR **Stop** GVGRWWWAVCAGGVGSRWCC  
WGGVASA

**Tabela 10.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 7 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	Swiss-Prot: P40827.2	Precursor de lipoproteína nlpD	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	30.4
	Swiss-Prot: A5CR97.1	Proteína lepA de ligação-GTP	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	30.4
	Swiss-Prot: B6ISG3.1	Glutamil-tRNA sintetase 1	<i>Rhodospirillum centenum</i>	30.4
5'3' - 2	Swiss-Prot: Q21KE0.1	Treonil-tRNA sintetase	<i>Saccharophagus degradans</i>	30.8
5'3' - 3	YP_003271883.1	Glutamate-cisteína ligase GCS2	<i>Gordonia bronchialis</i>	38.5
3'5' - 1	YP_002247985.1	Radical SAM enzima, família Cfr	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	35.8
	YP_003059318.1	Proteína Sel1	<i>Hirschia baltica</i>	34.7
	Swiss-Prot: Q03QT5.1	Fator de iniciação de tradução IF-2	<i>Lactobacillus brevis</i>	32.0
	Swiss-Prot: Q5FA03.1	Diadenosina tetrafosfatase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	32.0
	Swiss-Prot: A1JIW9.1	Fator de iniciação de tradução IF-2	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i>	31.6
	Swiss-Prot: C0MDY5.1	Fator de iniciação de tradução IF-2	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	31.6
3'5' - 2	YP_001618899.1	Família de proteínas AcrB/AcrD/AcrF	<i>Sorangium cellulosum</i>	39.3
	ZP_01864781.1	Proteína hipotética	<i>Erythrobacter</i> sp.	34.7
	Swiss-Prot: A7Z711.1	Treonil-tRNA sintetase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	31.6
3'5' - 3	YP_001986686.1	Proteína hipotética	<i>Lactobacillus casei</i>	35.4
	ZP_04672598.1	Proteína hipotética	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	35.4
	Swiss-Prot: A6W7Z2.1	Fator de iniciação de tradução IF-2	<i>Kineococcus radiotolerans</i>	31.6
	Swiss-Prot: Q60BG7.1	Glutamil-tRNA sintetase 1	<i>Methylococcus capsulatus</i>	30.8



#### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

WGALPCLSLLIPLLLKTL DGVLLCSQRSCCA **Stop** LSILTF **M Stop** LFAVGVCLV  
VS **Stop** RVT **M** KLCPTVVYISGVRLAVFFYLAFAC **Stop** CRPSSRWCVRCAS  
SCLTC **Stop** FFHLVL **Stop** RSYSCCVCSVWSGFLVSPFLPSPAPVLCRSPLG  
RGVSAVLSSASRVLSARADFAVCLSLCCVCLGEAWGAGGGGRSALVASV  
PGGVAGVVWRRL

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 11.

#### **4.2.10. Fragmento 9 gerado com H1-C:**

##### **4.2.10.1. Sequência refinada:**

5'TCCCGGGGGGTTTTTCAGGGGTCGAGTGGCCTGTTGGCCTCCGGGGTTTGTGACCCGTATTTACCC  
CTCGCGTGCTGCCTATCGCAGCATTGCTGCGCGCTGCTGGGCCTAATGCATAGCGCCTCCCCACGTG  
CGTCTGGTCGCTCGCGTCCGTGGCTCTGGGGCGTTCTGCCTTTCCATGCTGTCTTTGTGATCCTTGT  
GTGTCCACACGCTTTGTGATCGCGCGCGCTGACTCGCATGTGTTGTGCACCTCAGGTCCGGCCATTGC  
ATCGGTTTGACACATCGTGACACGTTTCGCGCCTGACTGCCCCGTGCAGCCGTGCACGTGCGCCCAT  
ATTGCGCCGTTTTGCAACTGCCGGCGATCAGAACTCTATAAGGTGCCCGCGAGGCAACTAGCCCGG  
CGTTGCGCCTCTATTTATCTATCACGCTCAATCAGAAAAACCTAGAAGGCGGCAAGTGGCGGTTACAA  
TCCAATAAGGGGCTACAGGTCACAGTCACT3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### **4.2.10.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:**

###### **a) 5'3' fase de leitura 1:**

VPGGFQGSSGLLASGVCQPYLPLACCLSQHCCALLGLMHSASPRASGRS  
RPWLWGVLPFHAVLCDPCVSTRFVIARADSHVLCTSGRPLHRFDTSCTRS  
RLTAPCSRARAPILRRFATAGDQNSIRCPARQLARRCASIYLSRSIRKT  
**Stop** KAASGGYNPIRGYRSQS

###### **b) 5'3' fase de leitura 2:**

SRGVFRGRVACWPPGFVSRIYPSRAAYRSIAARCWA **Stop** CIAPPHVRLVA  
RVRGSGAFCLS **M**LSFVILVCPHAL **Stop** SRALTR **M**CCAPQVGHCIGLTHRA  
HVRA **Stop** LPRAAVHVRPYCAVLQPAIRTL **Stop** GAPRGN **Stop** PGVAPLFYIY  
HAQSEKPRRRQVAVTIQ **Stop** GATGHS

**c) 5'3' fase de leitura 3:**

PGGFSGVEWPVGLRGLSAVFTPRVLPVIAALLRAAGPNA **Stop** RLPTCVWSL  
ASVALGRSAFPCCPL **Stop** SLCVHTLCDRAR **Stop** LACVVHLRSAIASV **Stop** HI  
VHTFAPDCPVQPCTCAHIAPFCNCRSELYKVPREATSPALRLYLSITLNQ  
KNLEGGKWRLQSNKGLQVTVT

**d) 3'5' fase de leitura 1:**

SDCDL **Stop** PLIGL **Stop** PPLAAF **Stop** VFLIERDR **Stop** IEAQRASCLAGHLIEF  
**Stop** SPAVAKRRN **M** GARARLHGAVRRERVDVSNRCNGRPEVHNTCESAR  
AITKRVDTQGSQRTAWKGRTPQSHGRERPDARGEALCIRPSSAQCCDR  
QHARGKYG **Stop** QTPEANRPLDP **Stop** KPPG

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

VTVTCSPLLDCNRHLPPSRFF **Stop** LSVIDK **Stop** RRNAGLVA SRGTL **Stop** SS  
DRRQLQNGAIWAHVHGCTGQSGANVCT **M** CQTD **M** ADLRCTTHASQRAR  
SQSVWTHKDHKGQHGAERPRATDASDQTHVGRRYALGPAARSNAAGS  
TRGVNTADKPRRPTGHSTPENPPG

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

**Stop** L **Stop** PVAPYWIVTATCRLLGFS **Stop** A **Stop** **Stop** INRGATPG **Stop** LPRGA  
PYRVLIAGSCKTAQYGRCTAARGSQARTCARCVK **M** QWPT **Stop** GAQH **M**  
RVSARDHKACGHTRITKDS **M** ERQNAPEPRTRATRRTWGG **M** H **Stop** AQQR  
AA **M** LR **Stop** AAREG **Stop** IRLTNPGGQQATRPLKTPRD

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 12.

**4.2.11. Fragmento 11 gerado com H1-C:**

**4.2.11.1. Sequência refinada:**

5'TGCTTTCTTTGTGACGTCGCTGGTCACCCTCGTGGTGGTTTTTCGTCAGCACCTGGCCTGTTACGCT  
CACATGGCGGCTTTGCTGTGTTTCTTTGACTTGGTTCTGCTTATGCGCTCCCGTAGTGTCCGCTTCTA  
GTGCCTTTCCCATGTGAACTTGCCTGCGGTGGCTGGACCTGCGTCCGTGCGTTGGGCGGGCAGCCCC  
GACTCGGTGCCTTCTGTATCATTGATCGAGGATGAGACGAGGGATTACGATGTAACGGTTCGTACATTC  
CTGCACTACACACTGGTGTGATGACGCACGATGTAACCTACGCATAACGACCGCCAATTCTGATTTGATA  
TGATCTATGCATTACATGGACGAGTACGCAGAGGACCCCTTAGGTGTATGGTAGCTGCACCCTT3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

**Tabela 11.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 8 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
3'5' - 1	NP_931300.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	38.9
	YP_001340474.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Marinomonas</i> sp.	38.9
	ZP_06125028.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Providencia rettgeri</i>	38.5
	NP_300066.1	Proteína hipotética	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	38.5
	ZP_06257434.1	ATPase cádmio-transportadora	<i>Providencia rustigianii</i>	38.1
	YP_002236160.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38.1
	ZP_06165631.1	ATPase translocadora de metal peado tipo-P	<i>Klebsiella variicola</i>	37.7
	GenBank: CBA75278.1	ATPase membrana translocadora de cátion tipo-P	<i>Arsenophonus nasoniae</i>	37.0
	YP_002892945.1	ATPase translocadora de metal peado tipo-P	<i>Tolomonas auensis</i>	36.6
	ZP_03319138.1	Proteína hipotética	<i>Providencia alcalifaciens</i>	36.6
	YP_001476447.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Serratia proteamaculans</i>	35.4
	ZP_01868673.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Vibrio shilonii</i>	35.0
	ZP_05888187.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	34.7
	ZP_06192547.1	ATPase transportadora de zinco/cádmio/mercúrio	<i>Serratia odorifera</i>	34.3
	GenBank: CAA04762.1	ATPase membrana translocadora de cátion tipo-P	<i>Proteus mirabilis</i>	34.3
3'5' - 3	Swiss-Prot: Q79F92.1	Proteína imunogênica não caracterizada da família PPE	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32.0
	Swiss-Prot: Q8KG38.3	Glucosamine-frutose-6-fosfato aminotransferase	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	30.8

#### 4.2.11.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução

da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

LLSL **Stop** RRWSPSWWFFVSTWPVHVTWRLCCVSLTWFLCAPVVSASSA  
FP **M Stop** TCLRWDLRPCVGRRPRLGAFCIIDRG **Stop** DEGLRCNGRTFLHY  
TLV **M** THDVTYA **Stop** RPPILI **Stop** YDLCITWTSTQRTP **Stop** VYGSCTL

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

CFLCDVAGHPRGGFSSAPGLFTSHGGFAVFL **Stop** LGSAYALP **Stop** CPLLVP  
FPCELAGGWTVCVRALGGDPDSVPSVSLIEDETRDYDVTVVHSCCTHW  
**Stop Stop** RT **M Stop** LTHNDRQF **Stop** FDMIYALHGRVRRGPLRC **MVAAP**

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

AFFVTSLVTLVVVFRQHLACSRH **M** AALLCFFDLVLL **M** RRSRVRF **Stop** CLSH  
VNLPAVAGPASVRWAATPTRCLLYH **Stop** SR **M** RRGIT **M Stop** RSYIPALHTG  
DDARCNLRIITANSDLI **Stop** S **M** HY **M** DEYAEDPLGVW **Stop** LHP

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

KGAATIHRLRGLRTRPCNA **Stop** IISNQNWRSLCVSYIVRHHQCVVQECTTV  
TS **Stop** SLVSSSINDTEGTEGSGPPNARTQVQPPQASSHGKGRSGHYGSA  
**Stop** AEPSQRNTAKPPCDVNRPGADEKPPRG **Stop** PATSQRKQ

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

RVQLPYT **Stop** GVLCLVHV **M** HRSYQIRIGGRYA **Stop** VTSCVITSV **Stop** CRN  
VRPLHRNPSSHPRSMIQKAPSRGRRPTHGRRSSHRRQVH **M** GKALEADTT  
GAHKQNQVKETQQSRHVT **Stop** TGQVLTKNHHEGDQRRHKS

##### f) 3'5' fase de leitura 3:

GCSYHTPKGSSAYSS **M Stop** CIDHIKSELAVV **M** RKLHRASSPVCSAG **M** YDR  
YIVIPRLILDQ **Stop** YRRHRVGVAAQRTDAGPATAGKFTWERH **Stop** KRTLRE  
RISRTKSKKHSKAA **M Stop** REQARC **Stop** RKTTTRVTS DVTKKA

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 13.

**Tabela 12.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 9 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	ZP_04448309.1	Proteína hipotética	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	33.5
	YP_003117111.1	Proteína de transporte ABC	<i>Catenulispora acidiphila</i>	33.5
5'3' - 3	ZP_03546249.1	2-dehidropantoato 2-redutase	<i>Comamonas testosterone</i>	35.0
	Swiss-Prot: Q5P702.1	UDP-3-O-acil-GlcNAc deacetilase	<i>Aromatoleum aromaticum</i>	30.4
3'5' - 1	NP_242488.1	Glutamato desidrogenase	<i>Bacillus halodurans</i>	34.7
	ZP_05620169.1	Proteína 1A penicilina-ligante	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	33.9
	Swiss-Prot: P50735.2	Glutamato desidrogenase NAD-específica	<i>Bacillus subtilis</i>	30.4
3'5' - 2	YP_002787227.1	Proteína hipotética	<i>Deinococcus deserti</i>	37.4
	Swiss-Prot: Q8E1H3.1	Fator de iniciação IF2 de tradução	<i>Streptococcus agalactiae</i> serogroup V	32.0
	Swiss-Prot: Q2NTJ7.1	tRNA-metiltransferase	<i>Sodalis glossinidius</i>	31.6

## 4.2.12. Fragmento 2 gerado com H1-T:

### 4.2.12.1. Sequência refinada:

5'GTAGACTCTAAGGCTAGCCCTGCCTGAGGGTTTTATGTCCCCGGATCAGGCCTGCGCACCCCCGGT  
GTTTTTCTGTGGCTGCGACCCACCCGCTAGCTGCTTGGTTGACAGCCTCGGTACCCCTGCTCCTT  
CTGACCCGGACTGAGCGCTCGACAGTCCTGTGTGGCCTGCCGGTGCTACCGATGCAGGCGGTACT  
CGCCTATGCGCTGAGTACCGTGTGCTGCTATGTGGCTCGTATCTCGCATTAGCTTGCAGATACATG  
GGCGTCACGCCAGAAGCGAAACAAAAGAACAGCACACCTACTTGCGCCCACTTAATCAAAGTAACA  
AACGGCGCAATGGAGTAGCAAGATAGATATACAAACAGAGCGAGGTACACCCTAAGATAGCCTAA  
GCCAGGAGCAGTAACCACAATGGGGAACAACAGCGGCTGAGACCAGCAAAGCATCACTATAGACG  
CACGACCACAAGTACTGTTTTTAAACCCAGAAAACAAGGCAGCAAGAGCGGAAATAAGAAGCAAAT  
AAACAAACAACAAGGACAAGAAAGAATGGGGAGAGACCAAAACCCCGGGAACGTAAGGCCGAACA  
GACCAAAGAGAGGACCTATCCAAGACAGAACGAAGGCGGAGAAACAACAAAAAGAAAAAAGCCA  
AGAAAGAACAACACAAACAGAGAGGAAAAAACACGGGACACAAAGTAACAAACAGAGCACGCACA  
GAACAACCAAATAACACCGACCGGAAAAAGGAGAACACCCGAAACGACAACCTGGGGAGAAGAACC  
GAGTGCGCCCACTTAATCAAAGTAACAACCGGCGCAATGGAGTAGCAAGATAGATATACAAACAG  
AGCGAGGTCACACCCTAAGATAGCCTAAGCCAGGAGCAGTAACCACAATGGGGAACAACAGCGGCT  
GAGACCAGCAAAGCATCACTATAGACGCACGACCACAAGTACTGTTTTTAAACCCAGAAAACAAG  
GCAGCAAGAGCGGAAATAAGAAGCAAATAAACAAACAACAAGGACAAGAAAGAATGGGGAGAGACC  
AAAACCCCGGGAACGTAAGGCCGAACAGACCAAAGAGAGGACCTATCCAAGACAGAACGAAGGCGG  
AGAAACAACAAAAAGAAAAAAGCCAAGAAAGAACAACAAACAGAGAGGAAAAAACACGGGAC  
ACAAAGTAACAAAACAGAGCACGCACAGAACAACCAAATAACACCGACCGGAAAAAGGAGAACACCC  
GAAACGACAACCTGGGGAGAAGAACCCGAG3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

### 4.2.12.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução

da sequência nucleotídica:

#### a) 5'3' fase de leitura 1:

RRL **Stop** G **Stop** PCLRVLCPRIRPAHPRCF SVAATHPPSCLVDSLGHPCSF  
**Stop** PGLSARQSCVACRCYRCRLLAYALSTVCLLCGSYLAFSLQIHGRHA  
RSETKEQHTYLRPT **Stop** SK **Stop** QTAAM **E Stop** QDRYTNRARSHPKIA **Stop** AR  
SSNHNGEQQLRPAKASL **Stop** THDHKYCFLNPRKQGSKSGNKKQINKQT  
RTRKNGERP KPRERKAEQTKERTYPRQNEGGETT KKKKKPRKNKHKQRG  
KNTGHKVTKQSTHRTTK **Stop** HRPEKGEHPKRQLGRRTRV RPT **Stop** SK **Stop**  
QTAAM **E Stop** QDRYTNRARSHPKIA **Stop** ARSSNHNGEQQLRPAKASL **Stop**  
THDHKYCFLNPRKQGSKSGNKKQINKQTRTRKNGERP KPRERKAEQTK  
RTYPRQNEGGETT KKKKKPRKNKHKQRGKNTGHKVTKQSTHRTTK **Stop** H  
RPEKGEHPKRQLGRRTR

**Tabela 13.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 11 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-C.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	NP_629492.1	Arginil tRNA sintetase	<i>Streptomyces coelicolor</i>	33.5
	YP_001055673.1	Acetil CoA acetiltransferase	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	33.5
5'3' - 2	GenBank: CBI14527.1	ATPase transportadora de cátion	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	35.8
	ZP_02920106.1	Proteína hipotética	<i>Streptococcus infantarius</i>	35.4
	Swiss-Prot: B1VHC6.1	UDP-N-acetilmuramoilalanina--D-glutamato ligase	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	29.6
	Swiss-Prot: O33367.1	DNA girase subunidade B	<i>Myxococcus xanthus</i>	29.6
5'3' - 3	ZP_05965093.1	Helicase II ATP dependente	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	33.1
	Swiss-Prot: Q67PD7.1	Proteína L19 ribossomal do 50S	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	28.9
3'5' - 2	Swiss-Prot: Q88V24.1	N-acetildiaminopimelato deacetilase	<i>Lactobacillus plantarum</i>	30.4
3'5' - 3	Swiss-Prot: Q6G767.1	DNA topoisomerase 3	<i>Staphylococcus aureus</i>	30.3
	Swiss-Prot: Q2FW03.1	DNA topoisomerase 3	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	28.9

**b) 5'3' fase de leitura 2:**

VDSKASPA **Stop** GFYVPGSGLRTPGVFLWLRPTRLAAWLTA SVTPAPSDPD  
**Stop** ALDSPVWPAGATDAGGYSP **M R Stop** VPCACYVARISHLACRY **M** GVTPE  
AKQKNSTPTCAPLNQSNKRRQWSSKIDIQTERGHTLR **Stop** PKPGAVTT **M** G  
NNSG **Stop** DQQKHHRRTTTSTVF **Stop** TPENKAARAEIRSK **Stop** TNKQGQE  
**R M** GRDQNPNGNVRPNRPKRGP IQDRTKAEKQQKRKKSQERTNTNREEKT  
RDTK **Stop** QNRARTEQPNNTRDKKENTRNDNWGEEPECAPLNQSNKRRQ  
WSSKIDIQTERGHTLR **Stop** PKPGAVTT **M** GNNSG **Stop** DQQKHHRRTTTST  
VF **Stop** TPENKAARAEIRSK **Stop** TNKQGQER **M** GRDQNPNGNVRPNRPKRGP  
IQDRTKAEKQQKRKKSQERTNTNREEKTRDTK **Stop** QNRARTEQPNNTRDK  
KENTRNDNWGEEPE

**c) 5'3' fase de leitura 3:**

**Stop** TLRLALPEGF **M** SPDQACAPPVFFCGCDPPA **Stop** LLG **Stop** QPRSPLLLL  
TRTERSTVLCGLPVLP **M** QAVTRLCAEYRVP **M** WLVSRI **Stop** LADTWASRQ  
KRNRKTAHLLAPHLIKVTNGGNGVAR **Stop** IYKQSEVTP **Stop** DSLSQEQ **Stop**  
PQWGTTAAETS K SITIDARPQVLFFKPKQTRQKERK **Stop** EANKQTNKD KK  
EWGETKTPGT **Stop** GRTDQREDLSKTEERRRNNKKEKKAKKEQTQTERKK  
HGTQSNKTEHAQNNQITPTGKRRTPETTTGEKNPSAPHLIKVTNGGNGVA  
**R Stop** IYKQSEVTP **Stop** DSLSQEQ **Stop** PQWGTTAAETS K SITIDARPQVLFFK  
PKQTRQKERK **Stop** EANKQTNKD KKEWGETKTPGT **Stop** GRTDQREDLSK  
ERRRRNNKKEKKAKKEQTQTERKKHGTQSNKTEHAQNNQITPTGKRRT  
ETTTGEKNP

**d) 3'5' fase de leitura 1:**

LGFFSPVVVSGVLLFPVGVWLFCACSVLLLCVPCFFLSVCVCSFLAFFSF  
LLFLRLRSVLD RSSLWSVRPYVPGVLVSPHSFSLFVCLFASYFRSCCLVF  
WGLKNSTCGRASIV **M** LLLVSAAVPHCGYCSWLRLS **Stop** GVTSLCLYIYLA  
TPLPPFVTLIKWGALGFFSPVVVSGVLLFPVGVWLFCACSVLLLCVPCFF  
LSVCVCSFLAFFSFLLFLRLRSVLD RSSLWSVRPYVPGVLVSPHSFSLFV  
CLFASYFRSCCLVFWGLKNSTCGRASIV **M** LLLVSAAVPHCGYCSWLRLS  
**Stop** GVTSLCLYIYLATPLPPFVTLIKWGASRCVLLFRFWRDAHVSAS **Stop**  
**M** RDTSHIAGTRYSAHRRVTACIGSTGRPHRTVERS VRVRRSRGDRGCQP  
SS **Stop** AGGSQPQKNTGGAQA **Stop** SGDIKPSGRASLRVY

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

SGSSPQLSFRVFSFFRSVLF GCSVRALFCYFVSRVFS S L F V F V L S W L F F L  
FCCFSAFVLSWIGPLFGLFGLTFPGFWSLPILSCPCLFVYLLLISALAALFS  
GV **Stop** KTVLVVRL **Stop** **Stop** CFCWSQPLLFPVITAPGLGYLRV **Stop** PRSVC  
ISILLHCRRLLL **Stop** LSGAHSGSSPQLSFRVFSFFRSVLF GCSVRALFCYF  
VSRVFS S L F V F V L S W L F F L F C C F S A F V L S W I G P L F G L F G L T F P G F W S L P I L  
SCPCLFVYLLLISALAALFSGV **Stop** KTVLVVRL **Stop** **Stop** CFCWSQPLLFPV  
VITAPGLGYLRV **Stop** PRSVCISILLHCRRLLL **Stop** LSGAQVGVLF FCFASG  
VTP **M** YLQAKCEIRAT **Stop** QAHGTQRIGE **Stop** PPASVAPAGHTGLSSAQSG  
SEGAGVTEAVNQAARRVGRSHRKT PGVRRPDPGT **Stop** NPQAGLALEST

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

RVLLPSCRFGCSPFSGRCYLVVLCVLCFVTLCPVFFPLCLCLFFLGF F F F F  
VVSPPSFCLG **Stop** VLSLVCSALRSRGFGLSPFFLVLVCLFICFLFPLLLPCF  
LGFKKQYLWSCVYSDAFAGLSRCCSPLWLLLLA **Stop** AILGCDLALFVYLS  
YSIAAVCYFD **Stop** VGRTRVLLPSCRFGCSPFSGRCYLVVLCVLCFVTLCPV  
FFPLCLCLFFLGF F F F F VVSPPSFCLG **Stop** VLSLVCSALRSRGFGLSPFFL  
VLVCLFICFLFPLLLPCFLGFKKQYLWSCVYSDAFAGLSRCCSPLWLLLLA  
**Stop** AILGCDLALFVYLS CYSIAAVCYFD **Stop** VGRK **Stop** VCCSFVSLLA **Stop** R  
PCICKLNARYEPHSRHTVLSA **Stop** ASNRCLHR **Stop** HRQATQDCRALSPGK  
EQG **Stop** PRLSTKQLGGWVAATEKHRGCAGLIRGHKTLRQG **Stop** P **Stop** SL



Do resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos a única que apresentou similaridade foi em 3'5' fase de leitura 1 com uma lipopoliproteína hipotética (YP\_001964931.1) de *Leptospira biflexa* com similaridade de 38.5%.

#### 4.2.13. Fragmento 3 gerado com H1-T:

##### 4.2.13.1. Sequência refinada:

```
5'GGCGGGGGCCGCATCCCCTTGGCAGTCTTTTGCATCTGCCCTCTGTGCCTGAGCAGTCCCCTGC
AATATGCCCTTCCTTGAGTGCTGTGTGTTGCCCTCTCTCTGCATGTGCGCCTGTATCTCAGCACAGT
CCCCATATATCTTGCTGTGCGGGCATTTCGCGGGTGTGTGTGCGCTATTGTCTCACGTGGTTTCCAG
GTCATCTGCGTTTCGTCTCGTGCAGAGGTGGCGCGGTGTGCTTCAAGCACAATACTACATTTTGCCGTT
GACTCACAGTGGGCACACCAGGTGTTACACAGTTACATACTGGCGCATAAGCATAACACAAGGACGT
ATTGGCACGTTGTAGGTCCTTGGCAACTTTCGGTACCGCCAATACACACTACGTAAGCCATATACG
TTAACGTAGTTTAGCTTCCCAAGACTCCTAGTTTTACGATGCCGTGCATTCCCCCGATTCTTGAATCC
AGCTACAGCAAATATGATACACACATGAGTTCTAGCACAGGAGCCCACTTCAATTAGAAGTTATGACA
GTATGCGAGGAGGCTCAAGTGTGGCAACACAACAGGAATATGGGGAGCCTGAGTCAGTGGACTATG
GTGTAGGCAATTTCGCCATATTTCTCCGCCAATACGGGCGACGGCCACATCAATAATATGGTGGCCAT
GCAATGCCCCGGCCACCGCGGACAAGGAGGCAACAACAATGACGACAATCATGCCGAATGGGCAAG
AATTGAGGTCAAGTTGGTAGCCACAGAACAATAGCAATACCAACGCGGGCTGGTTATAAACACCAATCTA
GATAAGAAGTTCGTACGAAAAGAATCAGTCAATTCACACGGGGCACTGGGCATTCAAAGATTTGCACA
CCTGGTGTGGCCATGCCTTAGCGGTGTGCGCCACTACGGAGATTCCCCATTTATACAGAGCTCGGT
AGACACCAACACAAGCCACAAGACTAATTTCAATAGATACACCAACAATTCCCGGAAAAGAAGAAT
CCAACCACAACACATAGCTAAAGCAGGAGGACCACCAATGGGCAAACGAAACAAAATAGAAGACCA
CATAGTAGGAGGGACCAGCAAATGTAGATGGATAGAGATAGGACAAAAAACTGACACACCACAGGG
GGAAAGGAACACAAAACAGGTAACAGGAGAATACCAAGGACACACCACAAGAGGAACAAATCGGGC
GAAGAACACCAGGAGTAGGAAC3'
```

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.13.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução

da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

```
RRGPHPLGSLHLPSVPEQSRCNMPFLECCVLPSSLHVRLYLSTVPIYLAV
GAFAGCCVRYCLTWFPGLRSSRAEVARCASSTILHFAVDSQWAHQVFT
QLHTGA Stop AYTRTYWHVVGWPWQLLRQYTLRKP YTFNVV Stop LPKTPS
FT M PCIPILESSYSKYDTH Met SSSTGAHFN Stop KL Stop QYARRLKCGNTT
GIWGA Stop VSGLWCRQFAIFLRQYGRRPHQ Stop YGGHA M PRPPRTRRQQ
Q Stop RQSCR M GKN Stop GQLVATEQ Stop QYQRGWL Stop TPI Stop IRSRTKRI
SQFNTGHWAFKDLHTWCCHALAVCATTEIPHLYTELGRHQHKATKTNFN
RYTQQFPERRIQPQHIAKAGGPPNGQTKQNRPHSRDQQ M Stop M DRDR
TKTLTHHRGKGTQNR Stop QENTKDTPQRGTNRRKNTRSN
```

**b) 5'3' fase de leitura 2:**

GGGRIPLAVFCICPLCLSSPAAICPSLSAVCCPLSC**M**CACISAQSPYILLS  
GHSRVAVCAIVSRGFQVICVRLVQRWRGVLQAQYYILPLTHSGHTRCSHS  
YILAHKHTQGRIGTL **Stop**VLGNYFGTANTHYVSHIRLT **Stop**FSPRLLVLRC  
RAFPRFLNPATAN**M**IHT **Stop**VLAQEPTSIRSYDS**M**RGSSVATQQEYGE  
ESVDYGVGNSPYFSANTGDGHINN**M**V**M**QCPGHRGQGGNNDDNHAEW  
ARIEVSW **Stop**PQNNSTNAAGYKHQSR **Stop**EVVRKESVNSTRGTGHSKIC  
TPGV**M**P **Stop**RCAPLRRFPYIQSSVDTNTKPQRLISIDTPNNSRKEESNH  
NT **Stop**LKQEDHQ**M**GKRNKIEDHIVGGTSKCRWIEIGQKH **Stop**HTTGKKEH  
KTGNRRIPRTHHKEEQIGGRTPGVG

**c) 5'3' fase de leitura 3:**

AGAASPWQSFASALCA **Stop**AVPLQYALP **Stop**VLCVALSPACAPVVSQHSPHI  
SCCRGIRGLLCALLSHVVSRSFAFVSCRGGAVCFKHNTTFCR **Stop**LTVGT  
PGVHTVTYWRISIHKDVLARCRSLAITSVPIHTT **Stop**AIYV **Stop**RSLASQD  
S **Stop**FYDAVHSPDS **Stop**IQLQOI **Stop**YTHEF **Stop**HRSPQLQLEV **M**TVCEEAQV  
WQHNRN**M**GSLSQWT **M**V **Stop**AIRHISPPIRATATSIIWWPCNAPATADKEA  
TT**M**TT**M**PNQGELRSVGSHTIAIPTRLVINTNLDKKSYEKNQSIQH GALG  
IQRFAHLVLPCLSGVRHYGDSFPIYRAR **Stop**TPTQSHKD **Stop**FQ **Stop**IHPTI  
PGKKNPTTTHS **Stop**SRRTTKWANETK **Stop**KTT **Stop** **Stop**EGPANVDG **Stop**R  
**Stop**DKNTDTPQGERNTKQVTGEYQGHTTKRNKSAEEHQE **Stop**E

**d) 3'5' fase de leitura 1:**

VPTPGVLPPICSSLWCVLGILLPLVLCSPFPVVCQCFPCISIHHLHLLVPPT **M**  
WSSILFRLPIWWSSCFSYVLWLDSSFRELLGVSIEISLCGFVLVSTELCI  
**Stop** **M**GNLRSGAHR **Stop** **G** **M**ATPGVQIFECVPRVELTDSFRTTSYLDWCL  
**Stop**PAALVLLLF CGYQLTSILAHSA **Stop**LSSLLLPPCPRWPGHC **M**ATILL **M**  
WPSPVLAEKYGELPTP **Stop**STDSGSPYSCCVATLEPPRILS **Stop**LLIEVGS  
CARTHVCIIFAVAGFKNRGNARHRKTRSLGKLN YVKRIWLT **Stop**CVLAVPK  
**Stop**LPRTYNVPIRPCVCLCAS **Mt** **Stop**LCEHLVCPL **Stop**VNGK **M** **Stop**YCA **Stop**  
STPRHLCTRRRTQ **M** **Stop**TWKPRETIAHTATRECPDSKIYGDCAEIQA **M** **Stop**QERG  
QHTALKEGHIAAGLLRHRGQ **M** **Stop**QKTAKG **M** **Stop**RRPPP

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

LLLLVFFRRFVPLCGVSLVFSCYLFCVPPFLWCVSVFVLSLSIYICWSLLL  
CGLLFCFVCPFGGPPAL**M**CCGWILLSGNCWVYLLKLVFVALCWCLPSSV  
YKWGISVVAHTAKAWQHVCCKSLNAQCPVLN **Stop**LILFVRLLI **Stop**IGVYN  
QPRWYCYCSVATN **Stop**PQFLPIRHDCRHCCLLVRGGGRIAWPPYY **Stop**C  
GRRPYWRRN**M**ANCLHHSPLTQAPHIPVVLPHLSLLAYCHNF **Stop**LKWAPV  
LEL **M**CVSYLL **Stop**LDSRIGG **M**HGIVKLGVLGS **Stop**TTLN VYGLRSVYWR  
SNCQGPTTCQYVLVYAYAPVCNCVNTWCAHCESTAKCSIVLEAHRATSA  
RDERR **Stop**PGNHVRQ **Stop**RTQQPANAPTARY **M** **Stop**GTVLR YRRTCRREGNTQ  
HSRKGILQRDCSGTEGRCKRLPRGCGPR

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

SYSWCSSADLFLFVVC PWYSPVTCFVFLSPCGVSVFLSYLYPSTFAGPSY  
YVVFYFVSFAHLVLLLL **Stop**LCVVVGGFFFGIVGCIY **Stop**N **Stop**SLWLCVGV  
YRALYINGESP **Stop**WRTPLRHGNTRCANL **Stop**Met **Stop**PSAPC **Stop**ID **Stop**FFSY  
DFLSRLVFITSRVGIAIVLWLPDNLNSCPFG **M**IVVIVVASLSAVAGALHGH  
IIDVAVARIGGEIWRIAYTIVH **Stop**LRLPIFLLCCHT **Stop**ASSHTVITSN **Stop**S  
GLLC **Stop**NSCVYHICCSWIQESGECTAS **Stop**N **Stop**ESWEAKLR **Stop**TY **M**AY  
VVCIGGTEVIAKDLQRANTSLC **M**L **M** **Stop**MRQYVTV **Stop**TPGVPTVSQRQNVVLC  
LKHTAPPLHETNADDLETT **Stop**DNSAHSNPR **M** **Stop**PRQQDIWGLC **Stop**DTGAH  
AGERATHSTQGRAYCSGTAQAQRADAKDCQGDAAPA

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 14.

#### 4.2.14. Fragmento 4 gerado com H1-T:

##### 4.2.14.1. Sequência refinada:

```
5'AAAAACAAAACCGAGGGGTACCCTGCCCTGCGCTCTGGCCCTGGTGGTTCCACGGGTTGGCGCT
ACACTGCGCCTGCTCTGTTTCGCCATTGCTGACCCGGACTCGGGCCACCGTGTGACTGGTACATCAC
ACGTGAGCCGCGCGATGCCTGGTCCGGACGACACACCGCTGGGCTGGCAGGTGGACGGGAACAG
GGGAAGGACTGCGGGAGGACGACCCGACGCGGGACGAGCAGACCCCGGGACACGGTAGAGTAC
GAAAAGAGAGCAAAAACCCAAGAGAACAACAAAACAGCAAACACACAAGACGAACACACTGACCAAG
AGCCCTGCGTGACCGGGGACTAGACGAACACGACGGAACAAGACACACAACACAGGAGACGAACAT
GAAGCACCAAAGAAAGGAGCGCGACAACAGAGAAAACAAACCGGACCCCAATCCACCACTGGCCCCC
CACACGAGCCAAATCAAAGACGAAGGCGCAGGAAAACGGGNCAACGACCAAAGCAGCACACACAG
GCCCCACACAACACACACACAACGACATGACAACAGACGTAACACAACAGAAAAAGAACCGAGCA
CCAGAACCAAAACAACAAACCAGACCAAAACCACAACAAAAACAACCAACCGCAGGACACACAAGAAAA
TAACAGCACACCAGAACCAGAAAGAAAACAAAAACACGAACAACCAAGCCCAAGCAAACCTCCACACGG
AAGACCAGCGCACACACGAGGAAACCAACACAAAAAAACACAAACCACACCAACCACAAAAACACA
AAAGCGCCACCCACACCGACCAACCCCAACGCCACCAACACAGCCACGGGACCCAACACAACA
AAAAACAGAAGCAAAAACCAACGAAAAACAGACCCAAAAAAACACAACCCACACACCACCACAAAGAA
AAACACAAACAAACAGAACACCAACCCAGCAACGGACGGGGCACACCCCAACAACACCAATAACATC
CACCCAAGCAACACCAAAACACGACACCACCGAGCACAAGCACCACGCACCAACACGAGAGCACCA
CCACACCACCAAAACACCAGAAAGAAAAGCCAAAAAAAGAAACATCAAACCAAC3'
```

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.14.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

```
QKTKPRGTLPCALALVVPVVGATLRLLCFAIADPDSGHRVVTGTSHVSRRD
AWSGRHTAGLAGGREQKGLREDDRRGTSRPPGHGRVVRKESKNPREQT
NSKHTRRTH Stop PRALRDRRLDEHDGTRHTTQETN M KHQRKERDNRETN
RTPIHHPPTRAKSKDEGAGKRXNDQSSTHRPPHNTHTTT Stop QQT Stop T
QQKKNRAPEPNNKPDQTTTQNNNRRTHKKNNSTPEPRRNTKHEQPAQA
NSTRKTSATRKPNTKKTQTTPTTKTQKRHPPTNPKRHQTQPRDPTQQ
KTEAKTNEKQTQKNTTHTPPQRKTQTNRTPTQQRTGHTPNNTITSTQATP
KHDTTEHKHHAPTREHHHTTKHQKEKPKKETSQ
```

**Tabela 14.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 3 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	ZP_04259562.1	Região da ancoagem da proteína Lpxtg	<i>Bacillus cereus</i>	38.1
	Swiss-Prot: Q3J7R7.1	Tetraacildissacarídeo 4'-quinase	<i>Nitrosococcus oceani</i>	32.0
	Swiss-Prot: Q8ZAE1.1	Alfa-N-acetilglucosaminil 1-fosfato transferase	<i>Yersinia pestis</i>	32.0
5'3' - 2	Swiss-Prot: C4LD55.1	Translocadora de NADH-quinona redutase subunidade E	<i>Tolomonas auensis</i>	32.7
	Swiss-Prot: Q65VU8.1	Translocadora de NADH-quinona redutase subunidade E	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	32.7
5'3' - 3	ZP_02085468.1	Proteína hipotética	<i>Clostridium bolteae</i>	43.5
3'5' - 3	Swiss-Prot: Q1I WV2.1	Glicogênio sintetase	<i>Deinococcus geothermalis</i>	33.9
	Swiss-Prot: B9M0D6.1	Gama-glutamil fosfato redutase	<i>Geobacter</i> sp.	32.0
	Swiss-Prot: Q39QR2.1	Gama-glutamil fosfato redutase	<i>Geobacter metallireducens</i>	32.0
	Swiss-Prot: B7H673.1	Gama-glutamil fosfato redutase	<i>Bacillus cereus</i>	32.0
	Swiss-Prot: B3EE24.1	Gama-glutamil fosfato redutase	<i>Chlorobium limicola</i>	32.0

**b) 5'3' fase de leitura 2:**

KKQNRGVPCPALWPWWFHGLALHCACSVSPLLTRTRATV **Stop** LVHHT **Stop**  
AGAMPGPDDTPLGWQVDGNRGRDCGRRTDAGRADPRDTVEYEKRAKTQ  
ENKQTANTQDEHTDQEPCVTGD **Stop** TNTTEQDTQHRRRT **Stop** STKERSAT  
TEKQTGPQSTTGPPHEPNQKTKAQENGXTTKAAHTGPHTTHTQRHDNRR  
KHNRKRTEHQNQTTNQTQKPHKTTTAGHTRKITA HQNPEETQNTNNQPK  
QTPHGRPAHTRGNQTQKKHKPHQPQKHKSATPHRPTPNATKHSHTQH  
NKKQKQKPTKNRPKKTQPTHHEKHKQTEHQPSNGRGTPTTP **Stop** HP  
PKQHQNTPSTSTTHQHESTTTPNTRKKSQKKKKHQTN

**c) 5'3' fase de leitura 3:**

KNKTEGYPALRSGPGGGSTGWRYTAPALFRHC **Stop** PGLGPPCDWYITREP  
ARCLVRTTHRWAGRWTGTGEGTAGGRPTRDEQTPGTR **Stop** STKREQPK  
RTNKQQTHKTNTLTKSPA **Stop** PATRRTRRNKTHNTGDEHEAPKKGARQQ  
RNKPDNPPLAPHTSQIKRRRRRKT XQRPKQHTQAPTQHTHND **M**TTDVN  
TTEKEPSTRKQQTRPNHNTKQQPQDTQEK **Stop** QHTRTQKKHKTRTTS  
SKLHTEDQRTHEETKHKKNNTNHTNHKNTKAPPHTDQPQTPPNTATGPNT  
TKNRSKNQRKTDPKKHNPHTTTKKNNTNKQNTNPATDGAHPQQHHNIHPS  
NTKTRHHRAQAPRTNTRAPPHHTPERKAKKRNIPK

**d) 3'5' fase de leitura 1:**

VGL **M**FLFFLAFLSGVWWCGGALVLRGACARWCRVLVLLGW **M**LWCCWG  
CAPSVAGLVFCLVFFFVVCGLCFVGSVFRWFLLLFFVVLGPVAVFGGV  
WGSVWGGAFVFLWLVWFVFLCLVSSCVRWSSVWSLLGLVVRVLCFF  
WVLVCCYFSCVSCGCCFVLWFGLVCLLVVLGFSVSVFTSVV **M**SLCVCC  
VGACVCCFGRXPVFLRLRLLIWLVWGASGGLGSGFLCCRAPPFFGASCS  
SPVLCVLFRRVRLVAGHAGLLVSVFVLCVCCFLVLLGFCSLFLVLYRVPV  
CSSRVGRPPAVPSPVPVHLPAQRCVVRTRHRAGSRV **M**YQSHGGPSPGQ  
QWRNRAGAV **Stop** RQPVEPPGPERRAGYPSVLF

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

LV **Stop** CFFFFWLFVFLVFGGVVVLSCWCVVVLVGGVVFVWCCVLLGGCYGVV  
GVPRPLLGWCSVCLCFSLWVCVGLVGLFFVGFVCFLLCWVPWLCLV  
AFGVGRCGVALLCFGCWGLCFVFWFPRVCAGLPCGVCLGWLFVFCV  
SSGFVCAVIFLVCPAVVLLCCGLVWFVWVFWCSVFLLLCLRLLSCRCV  
VWGPVCAALVXPFSCAFV **Stop** FGSCGGPVVDWGPVCFVSVALLSLVLH  
VRLCCVSCSVV **Stop** SPVTQGSWSVCSVFAVCLFSWVFAVSYSTV  
SRGSARPASVVLQSLPLFPSTCQPSGVSSGGPIAPAHV **Stop** CTSHTVAR  
VRVSNGETEQAQCSANPNHQQQSAGQGTPRFCL

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

WFDVSFFFGFVFWCLVWVWCSRVGAWCLCSVSVSCFGVAWVDV **M**VLLGV  
CPVRCWVGVFLVCFVLCGGVWVFFWVCFSLVFAVFCVGSRGCVWV  
RLGLVGVGWRFCVFFVGVVCFVFFVFGFLVCLVFRVEFAWAGCSCFVFL  
LGSVLLFFLCLVRLLLFCVWVWSGLLFGSGARFFFCCVYVCHVVVCLV  
GGLCVLLWSLXRFAPSSFDLARVGGQWWIGVRFVSLLSRSFLWCF **M**FV  
SCVCLVPSCSSRRSRALGQCVRLVCLLFCVSLGFLLSFRTLPCPGGL  
LVPRRSSRPFPCSRPPASPAQCVRPDQASRRLTCDVPVTRWPESGS **M**  
AKQSRRSVAPTRGTTARAQGRVPLGFV

Nenhuma das sequências de aminoácidos encontradas através do alinhamento derivado do fragmento 4 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador

H1-T, apresentou similaridade com qualquer proteína já descrita e disponível em BLASTp.

#### 4.2.15. Fragmento 5 gerado com H1-T:

##### 4.2.15.1. Sequência refinada:

```
5'AAACAAAAACAAAAATAAACACAAAAAACAACAGGAAGCTATGTGCGCGATGAGCAGGATCAGGC
CCTGCATGGATTTTAGTGAACATGTCCGGTGCACCTGGTACCCGAAGGAGCCAGTTTACTCAGTGATT
CGACGCATGTATGACATGCCCAAATAGCAGTAATGGAAGCAAACAAAGAGATTACTACATTGCAGAC
ACCCTGTGAGACAAATAAATTAANATTTGTGAGATGTGATAGTTTTAGTCGCTAGCACACGGCAGATC
AAATCTGTTTTCCACCTACCTGTGGCACCCCTCGTGACACTTGAAGTCGCACAGTATATCATCAGACTT
GAGCTGAGTCTACATCAGTTAGATACCTCACTAGACGAGCATTGACAAATTGTCAAGACCAAAACCTG
TTACAAGCGGGAGATGAAATAAAAAGATATGCCAGAGGAACGTAGTGAATGAAATAAGTTAACAGTGA
TGGCAGAAATTCTCAATCTCGGAACGAAGATGATGAAGACTAGGACTAAATTCCATTGACGTTCAATA
GCTCTCCTTCCGATTGGTTGAACGTTGGAAGTATTCTAACGCACATCATACGCGACGAGTTGATACCC
CGGAGTAGAGAGAATAAGCATATTTAATTAGTTAGTAGATACGAAATATAATGTTGGTATTAACAAGA
CAATCATTTAATATGGGGTAAAACCAGTTCAATAAAGACAACTATATTATTTAACTTATTAACAATCTC
AGGAATGACTCCAAAGATGTGGTAAAAAATCACCGACTGTACACAAAATATAGTTTAGAAAATACCCCG
GAGTAGAGAGAATAAGCATATTTAATTAGTTAGTAGATACGAAATATAATGTTGGTATTAACAAGACA
ATCATTTAATATGGGGTAAAACCAGTTCAATAAAGACAACTATATTATTTAACTTATTAACAATCTCAG
GAATGACTCCAAAGATGTGGTAAAAAATCACCGACTGTACACAAAATATAGTTTAGAAA3'
```

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.15.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução

da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

```
KTKNKNKHKKKKTGSYVRDEQDQALHGF Stop Stop TCPVHLVPEGASLLSDS
THV Stop HAQIAV MEAKQRDYIADTL Stop DK Stop IXICE M Stop Stop V Stop SLA
HGRSNLFSTYLWHP S Stop H LKSHSISDLS Stop VYIS Stop IPH Stop TSIDKLS
RPKPVTSGR Stop NKKICQRNVVNEIS Stop Q Stop WQKFSISERR Stop Stop RLG
LNSIDVQ Stop LSFRLVERWKYSNAHHTRRVDTP E Stop RE Stop AY LIS Stop
Stop IRNIM LVLNKTII Stop YGVKPVQ Stop RQLYLYTY Stop TISG MTPK MW Stop
KITDCTQNI V Stop KIPRSRENKHI Stop LVSRYEI Stop CWY Stop TRQSFN M G
Stop NQFNKDNYII Stop LIKQSQE Stop LQRCGKKSPTVHKI Stop FR
```

###### b) 5'3' fase de leitura 2:

```
KQKTKINTKKKQEA M C A M SRIRP C M DFSEHVRCTWYPKEPVYSVIRRM Y
D M PK Stop Q Stop WKQNKEITTLQTPCETNKLXFVRCDFSR Stop HTADQICF
PPTCGTPRDT Stop SRTVYHQT Stop AESTSVRYLTRRALTN C QDQNL L QAG
DEIKRYARGT Stop Stop M K Stop VNSDGRNSQSRNEDDED Stop D Stop I PLTFN
SSPSDWLNVGSILTHIIRDELIPRSRENKHI Stop LVSRYEI Stop CWY Stop TR
QSFN M G Stop NQFNKDNYII Stop LIKQSQE Stop LQRCGKKSPTVHKI Stop FRK
```

Y P G V E R I S I F N **Stop** L V D T K Y N V G I K Q D N H L I W G K T S S I K T T I L F N L L N N L R N  
D S K D V V K N H R L Y T K Y S L E

**c) 5'3' fase de leitura 3:**

N K K Q K **Stop** T Q K K N R K L C A R **Stop** A G S G P A W I L V N **Mt** S G A P G T R R S Q F T Q **Stop**  
F D A C **M** T C P N S S N G S K T K R L L H C R H P V R Q I N **Stop** X L **Stop** D V I G L V A S T R Q I K  
S V F H L P V A P L V T L E V A Q Y I I R L E L S L H Q L D T S L D E H **Stop** Q I V K T K T C Y K R E  
**Mt** K **Stop** K D M P E E R S E **Stop** N K L T V **M** A E I L N L G T K **M** M K T R T K F H **Stop** R S I A L L P  
I G **Stop** T L E V F **Stop** R T S Y A T S **Stop** Y P G V E R I S I F N **Stop** L V D T K Y N V G I K Q D N H L  
I W G K T S S I K T T I L F N L L N N L R N D S K D V V K N H R L Y T K Y S L E N T P E **Stop** R E **Stop**  
A Y L I S **Stop** **Stop** I R N I **M** L V L N K T I I **Stop** Y G V K P V Q **Stop** R Q L Y Y L T Y **Stop** T I S G **M** T  
P K **M** W **Stop** K I T D C T Q N I V **Stop** K

**d) 3'5' fase de leitura 1:**

F L N Y I L C T V G D F L P H L W S H S **Stop** D C L I S **Stop** I I **Stop** L S L L N W F Y P I L N D C L V  
**Stop** Y Q H Y I S Y L L T N **Stop** I C L F S L L R G I F **Stop** T I F C V Q S V I F Y H I F G V I P E I V **Stop**  
**Stop** V K **Stop** Y S C L Y **Stop** T G F T P Y **Stop** M I V L F N T N I I F R I Y **Stop** L I K Y A Y S L Y S G V  
S T R R V **Stop** C A L E Y F Q R S T N R K E S Y **Stop** T S **M** E F S P S L H H L R S E I E N F C H H C  
**Stop** L I S F T T F L W H I F L F H L P L V T G F G L D N L S **M** L V **Stop** **Stop** G I **Stop** L M **Stop** T Q L  
K S D D I L C D F K C H E G C H R **Stop** V E N R F D L P C A S D **Stop** T Y H I S Q X L I Y L S H R V S  
A **M** **Stop** **Stop** S L C F A S I T A I W A C H T C V E S L S K L A P S G T R C T G H V H **Stop** N P C R A  
**Stop** S C S S R T **Stop** L P V F F L C L F L F F V

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

F **Stop** T I F C V Q S V I F Y H I F G V I P E I V **Stop** **Stop** V K **Stop** Y S C L Y **Stop** T G F T P Y **Stop** M  
I V L F N T N I I F R I Y **Stop** L I K Y A Y S L Y S G V F S K L Y F V Y S R **Stop** F F T T S L E S F L R L F  
N K L N N I V V F I E L V L P H I K **Stop** L S C L I P T L Y F V S T N **Stop** L N **M** L I L S T P G Y Q L V A  
Y D V R **Stop** N T S N V Q P I G R R A I E R Q W N L V L V F I I F V P R L R I S A I T V N L F H S L R S  
S G I S F Y F I S R L **Stop** Q V L V L T I C Q C S S S E V S N **Stop** C R L S S S L **M** I Y C A T S S V T R  
G A T G R W K T D L I C R V L A T K P I T S H K X **Stop** F I C L T G C L Q C S N L F V L L P L L L F G H  
V I H A S N H **Stop** V N W L L R V P G A P D **M** F T K I H A G P D P A H R A H S F L F F F C V Y F C F L  
F

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

S K L Y F V Y S R **Stop** F F T T S L E S F L R L F N K L N N I V V F I E L V L P H I K **Stop** L S C L I P T L  
Y F V S T N **Stop** L N **M** L I L S T P G Y F L N Y I L C T V G D F L P H L W S H S **Stop** D C L I S **Stop** I I  
**Stop** L S L L N W F Y P I L N D C L V **Stop** Y Q H Y I S Y L L T N **Stop** I C L F S L L R G I N S S R **M** **M**  
C V R I L P T F N Q S E G E L L N V N G I **Stop** S **Stop** S S S S S F R D **Stop** E F L P S L L T Y F I H Y  
V P L A Y L F I S S P A C N R F W S **Stop** Q F V N A R L V R Y L T D V D S A Q V **Stop** **Stop** Y T V R L  
Q V S R G V P Q V G G K Q I **Stop** S A V C **Stop** R L N L S H L T N X N L F V S Q G V C N V V I S L F C  
F H Y C Y L G **M** S Y **M** R R I T E **Stop** T G S F G Y Q V H R T C S L K S **M** Q G L I L L I A H I A S C F F  
F V F I F V F C F

Do resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 15.

**4.2.16. Fragmento 6 gerado com H1-T:**

**4.2.16.1. Sequência refinada:**

5'GAAGAACAAAACACGAACAGACAAAACAGACAAAGAGACACGGCACAATGCGGCAACAGGCAAAGAT  
 ACACACACCCACGACACATAAGCAGCACAAGAGCCCGGGGTGTTAACCCGAACTGAGAGGAGAACAA  
 CGACCCCAGGGATGGTAACCCAGAACAGAAGACCAGAACCAAGCACGCACAACACAGAAAACAAAAA  
 ACAGAAGGACCGCCGAGGCCCCACGGCCGCCGGCCACACCATCGAGCCAGACCCACCCCA  
 CGAAGAGAGGGGCAGGAAACGCAAACAGAGACCCAGCGGACGAGGCCGCGCCACCCGCCCCGAGAG  
 AGGCAGAGACACCGCACAAACCACCAGAACGAAACAAGGCCACAAGACCCCCCAGCGCCCCACAC  
 AGACCAACCACAGCCCCGACGCAAACAAGACCAACGAGACATCCCGCAAGCCACCACCCACACACA  
 CCCGGACGGAAACGACACGCACCCACGAAGCAACCACCCAACACCAGAAAAGCGCACCCCAACAC  
 AGGAAAACGACGCAAAGCACACAACACGAACCCCAAGGACCAACGAACGAAGGACGCGCAGCCCG  
 CCAGCAGCCACGCCCCCGCGGACAGCCACGCACAACGGGCCAACCGGAAAAGCCACAAAAAGAG  
 CGAAGGGGAAATAAACACGGAAGAAACGACAGAGACGACGAAGGAGGAACAAGCGACGAGGGGG  
 AGAGAAACCGGGAGGAAGAACCACAAACAACGCCGAAAAGAAAGCAAGAGCAAGGGAGCGCGCACG  
 CCGACCGACACGCCCCCCCACCACACAACAACCCAACAAACAGACACTGCAACAGCGGA3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### 4.2.16.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução

da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

RRTKHEQTNRQRDTAQCGRNRQRYTHPRHISSTRARGVNP **Stop** EENNDP  
 RDGNPEQKTRTKHAQHRNKKTEGPPRPPRPPGATPSSPDPPEERGRKR  
 KQRPSGRGRATAPREAETPHKPPERKAKHTPQRPTQTNHSPTQTRPTR  
 HPASHHPPHTRTETTRTHEATTQHQKERTPTQENDAKHTTRTPKDQRTK  
 DAQPASSHAPADSPRTTGQPEKPKKERRGK **Stop** TRKKRQRRRRRNKRRG  
 GEKPGGRTTNAEKARARERARRPTRPPTTQQPNKQTLQQR

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

EEQNTNRQTDKETRHNAATGKDTHTHDT **Stop** AAQEPGVLTRTERRTTTPG  
**M**VTQNRPEPSTHNTETKKQKDRRGPHGRRAPHHRAQTHPTKRGAGNA  
 NRDPADEAAPPREERQRHRTNHQNETRPTRPPSAPHRPTTARRKQDQR  
 DIPQATTHHTPGRKRHAPTKQPPNTRKSAPQHRKTTQSTQHEPPTNER  
 RTRSPPAATPPRTAHAQRANRKSCHKSEGGNKHGRNDRDDEGGTSDEG  
 ERNREEEPQTTPKRKQEQGS AHADRHAPPPHNNPTNRHCNSG

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

KNKTRTDKQTKRHGTMRQQAKIHTPTTHKQHKSPGC **Stop** PELRGEQRPQ  
 GW **Stop** PRTEdqNQARTTQKQKNRRTAEAPTAAGRHTIEPRPTPREGQE  
 TQETQRTRPRHRPERGRDTAQTTRTKQGPQDPPAPHTDQPDPANKTN  
 ETSRKPPPTTHPDGNDTHPRSNHPTPERAHPNTGKRRKAHNTNPQGPTN  
 EGRAARQQPRPRGQPTHNGPTGKATKRAKGEINTEETTETTKEEQATRG  
 RETGRKNHKQRRKESKSKGARTPTDTPPHHTTTQQTDTATA

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

SAVAVSVCWVVVWWGGVSVGVRAPLLLLSFRRCLWFFLPVSLPLVACSS  
 FVVSVVSSVFISPFALFVAFVGPLCVGCPRGRGCWRAARPSFVGPWGF  
 VLCALRRFPVLGCALSGVGVLLRGCVSFSPGCVVGGGLRDVSLVLFASG  
 CGWSVWGAGGSCGPCFVLVCAVSLPLSGRWRGLVRWVSVCVSCPSLR  
 GVGLGS **M**VWRPAAVGASAVLLFFCFVVRWFVSSVLGYHPWGRCSPL  
 SSG **Stop** HPGLLCCLCVGVGVCIFACCRIVPCLFVCLSVRVLFF



#### **e) 3'5' fase de leitura 2:**

PLLQCLFVGLLCGGGACRSACALPCSCFLFGVVCGSSSRFLSPSSLVPPS  
SSLSFLPCLFPPSLFLWLFRLARCAWAVRGGVAAGGLRVLRSLVLGGSCC  
VLCVVFLCWGALFLVLGGCFVGACRFRPGVWWVACGMMSRWSCLRRAV  
VGLCGALGGLVGLVSWFVVRCLCLSRGGGAASSAGSLFAFPAPLFGW  
VWARWCGARRPWGPRRSFCFFVSVLCLVLSGGLLFWVTIPGVVLLSVRV  
NTPGSCAAYVSWVCVSLPVAALCRVSLSVCLFVFCSS

#### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

RCCSVCLLGCCVVGRRVGRARRSLALAFFSALFVVLPPGFSPRRRLFLLR  
RLCRFFRVYFPLRSFCGFSGWVVRGLSAGAWLLAGCASFVRWSLGVRV  
VCFASFSCVGVRSFWCWVVASWVRVSVRVCGGWVLAGCLVGLVGVGL  
WLVCVGRWGVLWALFRSGGLCGVSASLGAVARPRPLGLCLRFLPLSSWG  
GSGLDGVAPGGRGGLGGPSVFLFLCCACLVLVFCGSLPSLGSLSFSSQFG  
LTPRALVLLMCRGCVYLCLLPHCAVSLCLFVCSFVL

Das sequência de aminoácidos derivadas do fragmento 6, apenas três sequências apresentaram similaridade. A sequência 5'3' fase de leitura 2 apresentou similaridade com uma metaloprotease precursora de zinco de *Streptococcus pneumoniae* (Swiss-Prot: Q9L7Q2.2) com “score” de similaridade de 38,1%. Em 3'5' fase de leitura 1 foi encontrada similaridade com uma proteína da família de bacteriófagos TP901 de *Shewanella baltica* (YP\_001555317.1) com “score” de similaridade de 35,4%, e em 3'5' fase de leitura 2 com uma proteína hipotética de *Marinobacter aquaeolei* (YP\_960970.1) com 35,8%.

### **4.2.17. Fragmento 8 gerado com H1-T:**

#### **4.2.17.1. Sequência refinada:**

5'CACAAACAAACAACCAACAAACAATAAAAAAAAAACATACCAAAAAGTGAGGAGGTGAGTGTAAATATA  
GTGAAAAAAAAAGTCCCGTCGGGGTTTTTTGTAGGTATAGTGTAGCTAGTCAATAGTCGTCCCGGTAC  
ACCAGTTTTTTTAGGACAAGTGTGCAACACACCCGGAATAAGTAGTCAACAGTAGTGTGTTGGTATAA  
GTACAAATAGGGTAGTACACGGAATAGAAAGCAAAGTTACCGCTGTCGGACAAAAAATGTCAGGTGT  
GATGCAGCGTGTAGTGCAGTGTAAACGGTTGTTATCAAGTTATGATAATGTATTAATAAGTGTATGTAA  
CTAAGCTACCCAACAGCTGTTTCGTTACTTCTACTCCGTTCACTCCTACTTCACTACACACCCGACCCCTCA  
CCCACCACACAAATGCAAATCATTCAACCTACTTAAAACCAGACCCGTTTTCCACCACAGTTCTTATCA  
CCGTTTCATACCAACCAAGTTTCCGACACAAAAAAACATTACATCACAACATGTCCAACCTCCACAGCAC  
AAAAAAAAAGAAGCACAAAGAGACCGCACGAACCCACCAACCCAAACCCAAAAACAAAAAAAGCAA  
CACACCACCGCGCACCCCCAGGGGCCACCGACC3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### 4.2.17.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução da sequência nucleotídica:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

TQTNNQQTNKKKHTKK **Stop** GGQCNIKKKSRRGFL **Stop** V **Stop** CS **Stop** SIVV  
PGTPVFLGQVSNTPGISSQQ **Stop** CVGISTNRVVHGNRKQSYRCRTKNVRC  
DAACSAVLTVVIKL **Stop** **Stop** CINKC **M** **Stop** LSYPTAVRLLLLRSLLLHTRPS  
PTTQ **M** QIIQPT **Stop** NQTRFPPQFLSPFIPTKFPTQKKHYITTCPTPQHKKK  
KHKRPHEPTNHPTQNKKKATHHRAPPGATD

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

HKQTTNKQIKKNIPKSEEVSVI **Stop** **Stop** KKSPVGVFCRYSVASQ **Stop** SSPVH  
QFF **Stop** DKCRTHPE **Stop** VVNSSVLV **Stop** VQIG **Stop** YTEIESKVTAVGQK **M** **S**  
GV **M** QRVVRC **Stop** RLLSSYDNVLISVCN **Stop** ATQQLFAYFYSVHSYFITPDP  
HPPHKCKSFNLLKTRPVFHHSSYHRSYQPSFRHKKNITSQHVQLHSTKKR  
STRDRTNPPTTQPKTKKKQHTTAHPQGPP

##### c) 5'3' fase de leitura 2:

TNKQPTNK **Stop** KKTYQKVRRSV **Stop** YSEKKVPSGFFVGIV **Stop** LVNSRPRY  
TSFFRTSVEHTRNK **Stop** STVVCWYKYK **Stop** GSTRK **Stop** KAKLPLSDKKCQV  
**Stop** CSV **Stop** CGVNGCYQV **M** **I** **M** **Y** **Stop** **Stop** VYVTKLPNSCSLTSTPFTPTSSH  
PTLTHHTNANHSTYLKDPFSTTVLITVHTNQVSDTKKTLHNN **M** SNSTAQ  
KKEAQETARTHQPPNPKQKKSNTPPRTPRGHR

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

GRWPLGVRGGVLLFFCFGLGGWVRAVSCASFFCAVELD **M** **L** **Stop** CNVFF  
VSETWLV **Stop** TVIRTVVENGSGFK **Stop** VE **Stop** FAFVWVVRVGCDEVG VNG  
VEVSEQLLGLSVTYTY **Stop** YIIIT **Stop** **Stop** QPLTPHYTLHHT **Stop** HFLSDSGN  
FAFYFRVLPYLYLYQHTTVDYLFRCSTLVLKKLVYRGRLLTSYTIPTKNP  
DGTFFSLYYTDLLTFWYVFFYLFVGCFLV

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

VGGPWGCAVVCFFVVLGWVVGGFVRSVLVLLFFVLWSWTCCDV **M** FFPCR  
KLGWYER **Stop** **Stop** ELWWTGLVLSRLNDLHLCGG **Stop** GSGV **M** **K** **Stop** E **Stop**  
TE **Stop** K **Stop** ANSCWVA **Stop** LHTLINTLS **Stop** LDNNR **Stop** HRTTRCITPDIFCP  
TAVTLLSISVYYPICTYTNTLLTYS GCVRHLS **Stop** KNWCTGDDY **Stop** LAT  
LYLQKTPTGLFFHYITLTS SFLGM FFFICLLVCLC

##### f) 3'5' fase de leitura 3:

SVAPGGARWCVAFFLFWVGLVGSGLLCCFFLCCGVGHVV **M** **Stop** CFFC  
VGNLVG **M** NGDKNCGGKRVWF **Stop** VG **Stop** Met ICICVVGEGRV **Stop** **Stop** SRS  
ERSRSKRTAVG **Stop** LSYIHLLIHYHNLITVNTALHAASHLTFVQR **Stop** **L**  
CFLFPCTTLFVLIPTHYC **Stop** LLIPGVFDTCPKKTGVP GTTID **Stop** LHITYK  
KPRRDFFTILH **Stop** PPHFLVCFLLFVCWLFVC

O resultado do alinhamento encontra-se na Tabela 16.

#### 4.2.18. Fragmento 9 gerado com H1-T:

##### 4.2.18.1. Sequência refinada:

```
5'TCGCTTCGCTGCGCCCCGGGTTTATTCTTGTGCGGATGTGCAACCCTGGCGTTTCGGCCCCCTCTC
TCCGGGGCGGCTCGCCCGTCTTTCATTGGCCTCTGGGCGTGTTCCTCTCGTCTCTCGTTCTGGGTTG
GGCAGTGGCCGCTGTTTGCATGACCGTGTCTGGCACGCGCCGTCATCTCCCGTATGTGCTCCTTAGC
CTGTGCCGTAGTCAGTGTCTCCCGCAGGGTACCGCGCTATACTATGCCCTTGGCTCGATCGGTCACG
CTCACTGTCTGACCTTGGTTCTATATATTAGCCGAGTCCTGCCTTGCCTGACACTCCTAATCCCGCG
ACCCGTCCTCAGAGGCACACGATCTGGCATCGTTGCGCACGTTCACTCCAATAAGTACAGGTCCGAA
ACGGGCGGGGAAATTGCCAAATTACCCAAGAAAGGAATGCCCTGAAGATACACGCCCATAAAGGAAC
AGAATTAATGGAGTACGAAGAAGAGCCACCGGATAATTATAGTGGCCTATGGGCTAGCGGCATGTTCT
CTGGCACAAAGCC3'
```

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

##### 4.2.18.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução

da sequência nucleotídica:

###### a) 5'3' fase de leitura 1:

```
VASLRPGFILVRMSQPWRFGPSLRGGSPVFHWPLGVFSRLSFLGWAVAA
VCMTVSGTRRHLPYVLLSLCRSQCSRRVTALYYALGSIGHAHCLTLVLYIR
PSPALRDTPNPATRPQRHTIWHRCARSLQ Stop VQVRNNGRNCQITQERN
ALKIHAHKGTELMEYEEPPDNYSGLWASGMtFSGTK
```

###### b) 5'3' fase de leitura 2:

```
SLRCAPGLFLCGCRNPGVSAPLSGAARPSFIGLWACSLVSRSWVGQWPL
FA Stop PCLARAVISRMC SLACAVVSAPAG Stop PRYT M PLARSVTLTV Stop P
WFYILGRVLPVTLIPRPVLRGTRSGIVAHVHSNKYRSETGGEIAKLPKK
GM P Stop RYTPIKEQN Stop WSTKKSHRIIVAYGLAACSLAQS
```

###### c) 5'3' fase de leitura 3:

```
RFAAPRVYSCADVATLAFRPLSPGRLARLSLASGRVLSLVPGLGSGRCL
HDRVWHAPSSPVCAP Stop PVP Stop SVLPQGDRAILCPWLD RSRSLSDLGS
IY Stop AESCLA Stop HS Stop SRDP SSEAHDLASLRTFTPISTGPKRAGKLPNY
PRKECPEDTRP Stop RNRINGVRRRATG Stop L Stop WP M G Stop RHVLWHKA
```

###### d) 3'5' fase de leitura 1:

```
GFVPEN M PLahrPL Stop LSGGSSSYSINSVPLWACIFRAFLSWVIWQFPR
PFRTCTYWSERAQRCQIVCL Stop GRVAGLGVSRKAGLGLIYRTKVRQ Stop
A Stop PIEPRA Stop YSAVTLREH Stop LRHRLRSTYGR Stop RRV PDTV M QTAA
TAQPRNERRENTPRGQ Stop KTGEPPRREGPKRQGCDIRTRINPGRSEA
```

**Tabela 15.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 5 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 2	YP_003306696.1	Metiltransferase tipo 12	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	35.8
	Swiss-Prot: Q5XCX3.2	Fnilalanina-tRNA sintetase cadeia beta	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M6	32.3
3'5' - 3	Swiss-Prot: A9KMC1.1	Exodeoxiribonuclease subunidade 7	<i>Clostridium phytofermentans</i>	34.3
	Swiss-Prot: Q1QE45.1	Translocase subunidade secA	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	33.1
	Swiss-Prot: Q4FV40.1	Translocase subunidade secA	<i>Psychrobacter arcticus</i>	32.7
3'5' - 3	ZP_03754124.1	Proteína hipotética	<i>Roseburia inulinivorans</i>	35.8

**Tabela 16.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 8 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	Swiss-Prot: Q9L0M4.1	UPF0336 proteina SCO4636.	<i>Streptomyces coelicolor</i>	31.6
5'3' - 2	Swiss-Prot: Q39K87.1	Imidazol glicerol fosfato sintase subunidade hisH	<i>Burkholderia</i> sp.	32.0
	Swiss-Prot: Q63Q90.1	Imidazol glicerol fosfato sintase subunidade hisH	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	30.8
5'3' - 3	Swiss-Prot: P16538.1	Beta-quetoacil sintase 1	<i>Streptomyces glaucescens</i>	31.2
3'5' - 1	Swiss-Prot: Q55863.1	Piruvato quinase 1	<i>Synechocystis</i> sp.	31.2
3'5' - 2	ZP_06187409.1	Proteína hipotética	<i>Legionella longbeachae</i>	34.7
	Swiss-Prot: Q0RRR5.1	Proteína ribossomal S3	<i>Frankia alni</i>	31.6

#### **e) 3'5' fase de leitura 2:**

ALCQRTCR **Stop** PIGHYNYPVALLRTPILIFLYGRVSSGHSFLG **Stop** FGNFP  
ARFGPVLIGVNVNRNDARSCASEDGSRD **Stop** ECHARQDSA **Stop** YIEPRSDS  
ERDRSSQGHSIARSPCGSTDYGTG **Stop** GAHTGDDGACQTRSCQKQRPLPN  
PGTRDERTRPEANERRASRPGERGRNARVATSAQE **Stop** TRGAAKR

#### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

LCAREHAASP **Stop** ATIIIRWLFFVLH **Stop** FCSF MGVYLLQGIPFLGNLAISPP  
VSDLYLLE **Stop** TCATM PDRVPLRTGRGIRSVTQGRTRPNI **Stop** NQGQTVSV  
TDRAKGIV **Stop** RGHYPAGALTTAQAKEHIRE M TARARHGHANSGHCPTQER  
ETREHAQRP MKDGRAAPERGAETPGLRHPHKNKPGAQRSD

Do resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 17.

### **4.2.19. Fragmento 10 gerado com H1-T:**

#### **4.2.19.1. Sequência refinada:**

5'TGTGTCGCGTCCCTGCGTGTTCGTTGCGGATTGCCTGCTCTGTCGTGCTCCGCTCGTGCCTGAC  
GCAGTGACGCTAGTCGTGGTTGCGCACTACTTCATTGCGGGGCTCGTGCTGAGTCCATTGGGCCCGG  
TGCTCCCGCGGTCTTCTCGGGGGACTCGTTGCGACGCTTCCGCTCTGTTGCCGGGTTCTCCTTCTGG  
CCTCTGTGCGGCGCTTGTCTGCTGCCTGTTTGTGCGCTTTGGACCCTTCTTCTTCTCCTTTCTGGGCA  
TTGTATCATAGATATAACTGCATCCAAGACCAATCGCTAATCCGGGAATGCAGCTCCTACTCCTTATAG  
GAAGGACGTCACGTCGGTATATCATTGGAGCTCCGGCTATGCAAAGGAGGAATAGTCTGCGCGCCGC  
ATACAGGTCTCGCGTTGAAGAAAGCTCTTGCTCGCATCCAACA3'

A sequência de nucleotídeos não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência disponível em BLASTn.

#### **4.2.19.2. Sequências de aminoácidos provenientes da tradução**

**da sequência nucleotídica:**

##### **a) 5'3' fase de leitura 1:**

CVASLRVSLRIACSVVLPLVPDAVTLVVVRTYFIAGLVLSPLG PVLPRSSR  
GTRCDASALLPGSPSGLCAALARACLSTLWTL LLS PFLGIVS **Stop** | **Stop** LHPR  
PIANPGMQLLLLI GRTSRRYIIGAPAMQRRNSLRAAYRSRVEESSCSHPT

##### **b) 5'3' fase de leitura 2:**

VSRPCVFRCLPALSCFRSCLTQ **Stop** R **Stop** SWFALTSLRGSC **Stop** VHWAR  
CSRGLLGGLVATLPLCCRVL LLSVRRLLVPVCRFGPFFFLLSWALYHRY

NCIQDQSLIRECSSYSL **Stop** EGRHVGISLELRRLCKGGIVCAPHTGLALKKALARIQ

**c) 5'3' fase de leitura 3:**

CRVPACFVADCLLCRASARA **Stop** RSDASRGSHLLHCGARAESIGPGAPAV  
FSGDSLRRFRSVAGFSFWPLCGACSCLFVALDPSSFSFPGHCIIDITASKT  
NR **Stop** SGNAAPTYPYRKDVTSVYHWSSGYAKEE **Stop** SARRIQVSR **Stop** RKL  
LLASN

**d) 3'5' fase de leitura 1:**

CW **M** RARAFFNARPVCGAQTIPPLHSRSSNDIPT **Stop** RPSYKE **Stop** ELHSRI  
SDWSW **M** QLYL **Stop** YNAQERRKKKGPKRQTGTSKRRTEARRRTRQQSGS  
VATSPRRPREHRAQWTQHEPRNEVSANHD **Stop** RHCVRHERKHDRAGN  
PQRNTQGRDT

**e) 3'5' fase de leitura 2:**

VGCEQELSSTRDLYAARRLFLLCIAGAP **M** IYRRDVLPIRSRSCIPGLAIGL  
GCSYIYDT **M** PRKGERRRVQSDKQARASAAQRPEGEPGNRAEASQRVPR  
EDRGSTGPNGLSTSPAM **K** **Stop** VRTTTSVTASGTSGSTTEQAIRNETRDA

**f) 3'5' fase de leitura 3:**

LDASKSFLQRETC **M** RRADYSSFA **Stop** PELQ **Stop** YTDVTSFL **Stop** GVGAAFP  
D **Stop** RLVLDAVIS **M** IQCPGKEKEEGSKATNRHEQAPHRGQKENPATERKR  
RNESPEKTAGAPGP **M** DSARAPQ **Stop** SKCEPRLASLRQARAEARQSRQSA  
TKHAGTRH

O resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos está apresentado na Tabela 18.

**Tabela 17.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 9 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	YP_002799270.1	Proteína ativadora AcxR sigma-54 dependente	<i>Azotobacter vinelandii</i>	33.5
	Swiss-Prot: P55662.1	Transportador ABC	<i>Rhizobium</i> sp.	33.5
	Swiss-Prot: B7K1S0.1	Proteína engA GTP-ligante	<i>Cyanothece</i> sp.	30.8
	Swiss-Prot: Q46H20.1	Proteína engA GTP-ligante	<i>Prochlorococcus marinus</i>	30.8
	Swiss-Prot: A1JIK1.1	Simportador actP cátion/acetato	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i>	30.0
	Swiss-Prot: Q7NA72.1	Simportador actP cátion/acetato	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>Laumondii</i>	30.0
5'3' - 3	Swiss-Prot: Q8KFW8.1	Proteína-L-isoaspartato O-metiltransferase	<i>Chlorobaculum tepidum</i>	33.9
3'5' - 1	ZP_06011846.1	Proteína de membrana indutora de apoptose	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	37.7
	NP_860063.1	Proteína hipotética	<i>Helicobacter hepaticus</i>	33.9
3'5' - 2	YP_708021.1	Proteína hipotética	<i>Rhodococcus jostii</i>	35.0
3'5' - 3	YP_958615.1	Transportador ABC	<i>Marinobacter aquaeolei</i>	35.4
	ZP_01451683.1	Proteína hipotética	<i>Mariprofundus ferrooxydans</i>	35.0
	ZP_05111442.1	Proteína hipotética	<i>Legionella drancourtii</i>	34.3
	Swiss-Prot: A1U0A9.1	Proteína macB exportadora ATP-ligase/permease	<i>Marinobacter aquaeolei</i>	35.4
	Swiss-Prot: Q5NY25.1	Glutamil-tRNA sintetase	<i>Aromatoleum aromaticum</i>	30.4
	Swiss-Prot: P0AFQ4.1	Transporte de membrana interna permease ybhS	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	30.0

**Tabela 18.** Similaridades encontradas através do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento 10 gerado pelo oligonucleotídeo iniciador H1-T.

Fase de leitura	Identificação	Descrição	Organismo fonte	“Score” de similaridade
5'3' - 1	YP_002785173.1	Tioredoxina redutase	<i>Deinococcus deserti</i>	37.0
	YP_594279.1	Tioredoxina redutase	<i>Deinococcus geothermalis</i>	35.0
	YP_387699.1	Tioredoxina redutase	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	34.3
	ZP_06240157.1	Nucleotídeo açúcar desidrogenase	<i>Frankia</i> sp.	33.5
	Swiss-Prot: Q1QZV1.1	Transaldolase	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	30.4
	Swiss-Prot: Q8FLD1.3	Transaldolase	<i>Escherichia coli</i>	29.6
	Swiss-Prot: Q326L3.1	Transaldolase	<i>Shigella boydii</i>	29.4
5'3' - 2	ZP_05802700.1	Asparagina sintetase	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	33.9
	ZP_01734769.1	ATP fosforibosiltransferase	<i>Flavobacteria bacterium</i>	33.1
5'3' - 3	ZP_04702870.1	Diidropteroato sintase	<i>Streptomyces albus</i>	35.8
	NP_421063.1	Proteína da região de pentapeptídeos repetidos	<i>Caulobacter crescentus</i>	34.7
	YP_758081.1	Proteína hipotética	<i>Maricaulis maris</i>	33.5
	NP_884575.1	Flavocitocromo	<i>Bordetella parapertussis</i>	33.1
3'5' - 1	Swiss-Prot: Q3AXS7.1	Proteína pcxA proton extrusiva	<i>Synechococcus</i> sp.	31.2
	Swiss-Prot: C5BFB7.1	Fator IF-2 de iniciação da tradução	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	30.8
3'5' - 2	Swiss-Prot: A5GF86.1	Fator IF-2 de iniciação da tradução	<i>Geobacter uraniireducens</i>	30.8
3'5' - 3	Swiss-Prot: P59810.1	Proteína de membrana interna oxaA	<i>Nitrosomonas europaea</i>	30.0
	Swiss-Prot: Q8PMX4.2	Catalase-peroxidase	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i>	29.6
	Swiss-Prot: Q3BVY2.1	Catalase-peroxidase	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	29.6



Com o intuito de verificar aumento de similaridade entre as sequências de aminoácidos geradas neste trabalho, com as sequências de proteínas disponíveis nos bancos de dados consultados, foram selecionados alguns fragmentos de aminoácidos que apresentaram segmento maior de aminoácidos seguido de um códon de parada. Os fragmentos selecionados foram os seguintes:

#### 4.2.1. Fragmento 1.1 gerado com H1-A:

##### c) 5'3' fase de leitura 3:

LSLIPLGFLGMCLVPHAFVRRATTSCGATVCGCSLSAFFARGYGSRLLCDR  
GSRLSISLDLRCRAAACIVLDWPLPLCGFLGPMPLPLAYGDVTRAHVLTLLR  
CCRFCSARLPFRSVAGA Stop

#### 4.2.2. Fragmento 1.2 gerado com H1-A:

##### e) 3'5' fase de leitura 2:

FVLSLWSSFVFFLVSWRAFLGGCRSFWFFYYWGYALVSI~~M~~SRVCSCGCL  
LGFAPPCVFSLIVLPLCVHFVPPGLFSCFVLPLVPCVWHGPFWF~~M~~FACGF  
SSWSSPSSCVFAHVGCFPLPYLAGLSDVSVICLAACFGPFVCICSARIVSIG  
GPGPICVLWVLFVFCVCFINQFVG Stop

#### 4.2.3. Fragmento 3 gerado com H1-A:

##### a) 5'3' fase de leitura 1:

LLHRDRQRGTSETTREDGPNRKHAGNQKDKEEKKPEKTETKGRQTTEK  
KEQKKKKKTKGKRKKTQSDKLEPKNEDTGDQKQRTARQKTETTTTRKEKQK  
KQEQKKKKKQRATEKQHKKRAPKQDEKKQKEKTQKQK~~M~~TTHKEKRDDE  
QTQKNKPTQKNTNKQTTKGEKTKEKRHNKTKTKQNKGGKHKRQNHKPK  
ETTQRKPRNKQQRKRKHRTKTKKRTREKKRKTQSKKEKKQ

##### d) 3'5' fase de leitura 1:

SCFFSFLLCVFLFFSLVLFVFLCFRFLCCLFLGLRCVVSFGLCWFCLLC  
FFPLFCVVFVLLWRFSFVFSFVCLFVFFCVGLFFCVCSSSLFSLWVVIF  
CFCVFSFCFFSSCFGALFLCCFSVALCFFFFCCSCFFCFSFLVVVSVFCR  
AVLCLSPVSSFFGSSLVLCVFFLFPVFFFFFCSFFSVVCLPFVSVVSGFF  
SSLSF StopFPACFLFCGPSSRVVSLVPRWRSRCRS Stop

#### 4.2.4. Fragmento 4 gerado com H1-G:

##### b) 5'3' fase de leitura 2:

LVPHVPPRWVFSAPVGVRLAVFLTPVAVRTRSVSPTSLWPFRRVTSGAHL  
LGTWTLHCGSLRNLESFGPGVQSRVSDNEHCEKK Stop

#### 4.2.5. Fragmento 8 gerado com H1-G:

##### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

AFLETRNLSSFIEPVRVTLSHLVC SAIK M TDRRRRRRYAIHTVPQPTLLLEG  
SAAHTAPTAWTQMKRKNATQFRDGHVARLSKQKELTND DGRSNRSLQGT  
GKTSSLL Stop

#### 4.2.6. Fragmento 9 gerado com H1-G:

##### **d) 3'5' fase de leitura 1:**

RWCFVCF L P G F G F S W C L V V F A G A L C V F F L G L V F R G V W L F S G G F F W L S R L  
F W F P P F S L W R R L L G W S C G A S R I F R F D L P C I F V G V L F P M L G V R L D V S S P S R  
G R F H C V F F A F F L A S V L F S F F L C F F S C F S V L S V A V S R I S V V S L L F L L S F S Stop

#### 4.2.7. Fragmento 4 gerado com H1-C:

##### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

RYCNADSLIYARTECLSTRCP R Y S L V I L S P A Q A A L E Q V V Q K R S D I R G N P V T  
A L V R E A L M K Q L V N I Y P T P S A V A R P L A A R R M N Y G R V L D T A R G G N V P E P L D S  
R R R G V C R S V E T A L Stop

#### 4.2.8. Fragmento 7 gerado com H1-C:

##### **b) 5'3' fase de leitura 2:**

V P G G P A P A W S F Y R T R R C H A A P C S W L T G H R T S V V S C P W A G R I D A L F V R R V  
L S S T G R P I F P S C C R D T R R P G S R A F A Y W R C T S L R V C A L E L L D V A A P F I L L D L  
L T F H T L P G F V P L I G R L A I H L M I G P P W G P R G L Stop

##### **f) 3'5' fase de leitura 3:**

P F C C Q Y F D W F V L Q L P F T V F L Y N R F H V C N Y S Q L L N N A A S H S E S A G S P G W T  
D H K V D S Q S P N K G D E P R Q G M E G Q K V Q K Y K R R G N V E Q L K R T H T Q R R T A P I  
C K G T R P G T T R V A A A R G E Y R A T S G R E H A A N E Q G V D P P R P R T R H Y R R T V A  
G Stop

#### 4.2.9. Fragmento 8 gerado com H1-C:

##### **b) 5'3' fase de leitura 2:**

K P T P H H P S N T T G N R R H Q R R P P T T S A P R L T E T D T A K R Q T D G E V R A S G Q H P  
G S R R G Q H S R N T T T Q R G T T K D G G G R G E K R G D H E K A R P N R T N T T R I T P L Q H  
K M K E L T S K T R A R T H T Y A P A G G W T T L T S K G Stop

#### 4.2.10. Fragmento 9 gerado com H1-C:

##### **a) 5'3' fase de leitura 1:**

V P G G F Q G S S G L L A S G V C Q P Y L P L A C C L S Q H C C A L L G L M H S A S P R A S G R S  
R P W L W G V L P F H A V L C D P C V S T R F V I A R A D S H V L C T S G R P L H R F D T S C T R  
S R L T A P C S R A R A P I L R R F A T A G D Q N S I R C P A R Q L A R R C A S I Y L S R S I R K T  
Stop

#### 4.2.12. Fragmento 2 gerado com H1-T:

##### **d) 3'5' fase de leitura 1:**

GVTSLCLYIYLATPLPPFVTLIKWGALGFFSPVVVSGVLLFPVGVIVLWLFCA  
CSVLLLCVPCFFLSVCVCSFLAFFSFLFLRLRSVLDLDRSSLWSVRPYVPGV  
LVSPHSFLSLFVCLFASYFRSCCLVFWGLKNSTCGRASIVM LLLVSAVV  
PHCGYCSWLRLS Stop

#### 4.2.13. Fragmento 3 gerado com H1-T:

##### **e) 3'5' fase de leitura 2:**

FLLLVFFRRFVPLCGVSLVFSYLCVFPFLWCVSVFVLSLSIYICWSLLL  
CGLLFCFVCPFGGPPALAMCCGWILLSGNCWVYLLKLVFVALCWCLPSS  
VYKWGISVVAHTAKAWQHQVCKSLNAQCPVLN Stop

#### 4.2.14. Fragmento 4 gerado com H1-T:

##### **e) 3'5' fase de leitura 2:**

CCCCFWLFFLVFGGVVVLSCWCVVLLVGGVFWCCLGGCYGVVGGVPRP  
LLGWCSVCLCFSLWCVGCVFLGLFFVGFCCFLLCWVPWLCLVAFGVG  
RCGVALLCFCGWGLCFFCVWFPRVCAGLPCGVCLGWLFVFCVSSGFV  
CAVIFLVCPAVVVLCCGLVWFVWFVWCSVLFLLCLRLLSCRCVCVWGP  
VCAALVVXPFSCAFVF Stop

#### 4.2.16. Fragmento 6 gerado com H1-T:

##### **a) 5'3' fase de leitura 1:**

EENNDPRDGNPEQKTRTKHAQHRNKKTEGPPRPPRPPGATPSSDPDPHE  
ERGRKRKQPSGRGRATAPREAETPHKPPERKKAHKTQQRPTQTNHSP  
QTRPTRHPASHPPHTRTETTRTHEATTQHKKERTPTQENDAKHTTRTP  
KDQRTKDAQPASSHAPADSPRTTGQPEKPKKERRGK Stop

#### 4.2.18. Fragmento 9 gerado com H1-T:

##### **a) 5'3' fase de leitura 1:**

VASLRPGFILVRMSQPWRFGPSLRGGSPVFHWPLGVFSRLSFLGWAVAA  
VCM TVSGTRRHLPLYVLLSLCRSQCSRRVTALYALGSIGHAHCLTLVLYIR  
PSPALRDTPNPATRPQRHTIWHRCARSLQ Stop

#### 4.2.19. Fragmento 10 gerado com H1-T:

##### **a) 5'3' fase de leitura 1:**

CVASLRVSLRIACSVVLPVDAVTLVVVVRTYFIAGLVLSPLGPVLPRSSR  
GTRCDASALLPGSPSGLCAALARACLSLWTL LLS PFLGIVS Stop

Não foi verificado aumento de similaridade no alinhamentos entre os fragmentos de aminoácidos selecionados com as proteínas disponíveis em BLASTp.

Treze sequências do total de fragmentos sequenciados, totalizando 68%, apresentaram GC% inferior ao descrito para o gênero que é em torno de 57%. Seis sequências apresentaram a percentagem próximas das percentagens descritas para *Brucella* sp. A média do GC% das sequências obtidas (53%) foi inferior ao descrito para o gênero *Brucella*. De acordo com Maquart *et al.* (2008), fragmentos com menor teor de GC% podem indicar a possibilidade destes fragmentos fazerem parte de ilhas genômicas, pois estas regiões apresentam conteúdo de GC variável em relação ao restante do genoma (Rajashekara *et al.*, 2004).

Quando alinhadas entre si, as sequências obtidas também não apresentaram alinhamento significativo. Todas as 19 sequências se apresentaram como fragmentos únicos, indicando que os fragmentos obtidos não são oriundos de contaminação de amostra ou ambiental. Maquart *et al.* (2008), também obtiveram uma nova sequência da espécie *B. pinnipidialis* após clonagem e sequenciamento, indicando que existem certas variações genômicas entre as brucelas apesar da grande homologia do gênero. Paulsen *et al* (2002), comparando o genoma de *B. suis* e *B. melitensis* encontraram extensa similaridade entre os dois genomas estudados, porém também detectaram 7.307 polimorfismo em um único nucleotídeo, dentro de uma estrutura compartilhada de 3.237.820 bp, indicando a possibilidade de se detectar fragmentos de DNA exclusivos para estas espécies.

Neste estudo o alinhamento das sequências de nucleotídeos através da plataforma BLASTn não apresentou nenhuma similaridade significativa com as sequências disponíveis neste banco de dados. Estas sequências, ao serem

traduzidas pelo programa “SwissProt”, geraram 114 sequências de aminoácidos. Quando alinhadas pelo BLASTp, 65 destas sequências (57%) apresentaram graus de similaridade com proteínas disponíveis nos bancos de dados consultados. Esta similaridade variou de mínima de 28,9% e máxima de 43,5%.

Dentre o total de proteínas (168 proteínas) que apresentaram similaridade com as sequências de aminoácidos obtidas neste trabalho, 143 sequências (85%) foram atribuídas a proteínas funcionais, enquanto que as demais 25 sequências (15%) foram atribuídas a proteínas hipotéticas de outros microrganismos. Del Vecchio *et al.* (2002) também encontrou resultados similares ao sequenciar o genoma de *B. melitensis*. Eles observaram atribuição funcional para 2.481 sequências (78%), enquanto que 477 sequências (14,97%) foram atribuídas a proteínas hipotéticas de outros microrganismos.

Entre aquelas que receberam atribuição funcional está a sequência semelhante a uma proteína ATPase transportadora de metal pesado. Esta proteína é responsável pelo transporte de íons metálicos como o cobre, prata, zinco, cádmio, chumbo e cobalto através das membranas biológicas (Gatti *et al.*, 2000). As funções exercidas por estas bombas incluem a manutenção da homeostase de metais essenciais como o cobre, cobalto, ferro e zinco; atribuição de resistência a concentrações tóxicas de chumbo, cádmio, cobre, zinco e prata; e fornecimento de íons metálicos específicos para enzimas alvos (Chelly *et al.*, 1993). Esta proteína representou um total de 9,52% das proteínas encontradas, sendo a proteína de maior frequência, ocorrendo em diferentes

microrganismos como, por exemplo, *Photorhabdus luminescens*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia proteamaculans* e *Vibrio coralliilyticus*.

A proteína de atribuição funcional com segunda maior frequência (4,17%) foi o fator de iniciação de tradução IF2, ocorrendo em microrganismos como *Lactobacillus brevis*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus equi*, *Kineococcus radiotolerans*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella ictaluri* e *Geobacter uraniireducens*. Esta proteína dirige os passos básicos do processo de iniciação em procariotos ligando-se ao tRNA formil-metionina iniciador e auxiliando na apresentação deste ao complexo de iniciação (Guillon *et al.*, 1993; Meinnel *et al.*, 1993).

A proteína DNA topoisomerase 3 de *Staphylococcus aureus* foi a proteína que apresentou menor similaridade, enquanto que uma proteína hipotética de *Clostridium bolteae* apresentou a maior similaridade entre todas as proteínas. Comparando estes resultados com Del Vecchio *et al.* (2002) somente a proteína de transporte ABC foi um achado em comum, sendo que as demais proteínas de relevância descritas por ele, foram diferentes das descritas neste trabalho.

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o sequenciamento dos fragmentos obtidos após SE-AFLP é útil para a obtenção de sequências inéditas de microrganismos.

O sequenciamento resultou em 19 sequências únicas de *Brucella* sp. que deverão ser utilizadas em futuros testes para verificar sua especificidade e capacidade discriminatória entre as cepas.

A análise das proteínas hipotéticas dessas sequências demonstrou que mais de metade apresenta similaridade com proteínas de outros microrganismos, mas não especificamente com proteínas já descritas para o gênero *Brucella*. E esta mesma análise demonstrou a presença de algumas sequências inéditas.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os fragmentos de DNA de *B. abortus* que foram selecionados neste estudo, serão utilizados em estudos futuros visando a tipificação de *Brucella* sp. até nível de biovar. Serão úteis na confecção de oligonucleotídeos iniciadores e sondas que serão utilizados em ensaios de PCR e hibridização DNA-DNA.



## 7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.C. et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v.56, n.2, p.275-276, 2004.
- ALTON, G.G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, 190p, 1988.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Inglaterra, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ALVAREZ, R.C. et al. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. **Cellular Microbiology**, Inglaterra, v.8, n.8, p. 1322–1335, 2006.
- BAEK, B.K. et al. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v.67, n.4, p.312-314, 2003.
- BARDENSTEIN, S. et al. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the *PstI* site polymorphism of its *omp2* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.40, p.1475-1480, 2002.
- BARDENSTEIN, S.; STRADA, V.; BANAI, M. *Brucella*: a fastidious bacteria but a virulent pathogen. **Veterinary Journal**, Inglaterra, 2009. doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.004.
- BOUNAADJA, L. et al. Real time-PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and pr target genes. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.137, p.156-164, 2009.
- BRASIL. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual técnico. Brasília, 2006. 184p.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.90, p.435-446, 2002.

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.32, n.11, p.2660-2666, 1994.

BRICKER, B.J. et al. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.38, p. 1258-1262, 2000.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA eletrophoresis. **BioTechniques**, Inglaterra, v.36, n.2, p.214-215. 2004.

CASSATARO, J. et al. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.11, n.1, p.111–114, 2004.

CHAIN, P.S. et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.73, p.8353-8361. 2005.

CHELLY, J. et al. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. **Nature genetics**, Estados Unidos, v.3, n.1, p.14-19, 1993.

CLOECKAERT, A. et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. **Microbiology**, Estados Unidos, v.141, p.2111-2121, 1995.

CLOECKAERT, A. et al. Polymorphism at the dnaK locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species specific marker. **Journal of Medical Microbiology**, Inglaterra, v.45, p.200-205, 1996.

CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes and Infection**, Inglaterra, v.3, p.729–738, 2001.

CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* strains isolated form marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification test. **Microbes and Infection**, França, v.5, n.7, p.593-602. 2003.

CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v. 7, p. 835-839, 2000.

CONCEPCIÓN, L. et al. Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v.58, n.3, p.549–556, 2006.

CORBEL, M.J.; BANAI, M. Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, Springer, NewYork, pp.370–386. 2005.

CORNER, L.A.; ALTON, G.G.; IIER, H. Distribution of *Brucella abortus* in infected cattle. **Australian Veterinary Journal**, Austrália, v.64, n.8, p.241-244, 1987.

COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **The Journal of Applied Bacteriology**, Inglaterra, v.81, n.3, p.267-275, 1996.

DAMES, S. et al. Clinical problem-solving. Don't knowmuch about history. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v.352, n.22, p.2338-2342, 2005.

DAWSON, C.E. et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. **BioMedCentral Microbiology**, Inglaterra, v.8, p.224-231, 2008.

DELPINO, M.V.; FOSSATI, C.A.; BALDI, P.C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other Alpha-Proteobacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.11, n.5, p.868–873, 2004.

DEL VECCHIO, V.G. et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.1, p.443-448, 2002.

FERREIRA, C.R. et al. Espondilodiscite brucelósica: relato de caso. **Veterinary Medicine**, Estados Unidos, v.35, p.673-681. 2002.

FERREIRA, T. et al. Inquérito sorológico da brucelose canina através da utilização de antígeno externo e interno de *Brucella canis* e *Brucella ovis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Brasil, v.14, n.3, p.167-168, 2007.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.57, p.2688-2693. 2007.

FOSTER, J.T. et al. Real-Time PCR assay of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.46, n.1, p.296-301, 2008.

FOSTER, J.T. et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.191, n.8, p.2864-2870. 2009.

FOX, K.F. et al. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.36, n.11, 1998.

FRANCO, M.P. et al. Human brucellosis. **The Lancet Infectious Disease**, Estados Unidos, v.7, n.12 p.775-786. 2007.

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J-P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Inglaterra, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

GÁNDARA, B. et al. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.39, n.1, p.235–240, 2001.

GARCÍA-YOLDI, D. et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. **Clinical Chemistry**, Estados Unidos, v.52, n.4, p.779-781. 2006.

GATTI, D.; MITRA. B.; ROSEN, B.P. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v.275, n.44, p.34009-34012, 2000.

GEE, J.E. et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.42, p.3649-3654, 2004.

GODFROID, J. et al. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.90, p.461-477, 2002.

GODOY, A.M. et al. Sobre um caso de infecção humana por *Brucella canis* em laboratório. **Arquivo da Escola de Veterinária UFMG**, v.31, p. 141-145.1979.

GORVEL, J-P. *Brucella*: a Mr. “Hide” converted into Dr. Jekyll. **Microbes and Infection**, França, v.10, n.9, p.1010-1013, 2008.

GRILLÓ, M.J. et al. Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v.58, n.3, p.622–626, 2006.

GUILLON, J-M. et al. Importance of formylability and anticodon stem sequence to give a tRNA(Met) an initiator identity in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Estados Unidos, v.175, n.14, p.4507-4514, 1993.

HALLING, S.M.; TATUM, F.M.; BRICKER, B.J. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. **Gene**, Holanda, v.133, p.123-127, 1993.

HALLING, S.M. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.187, n.8, p.2715-2726, 2005.

INPPAZ. 1994. Instituto Panamericano de Proteccion de Alimentos y Zoonoses. **Documento de trabajo para la Reunion sobre prevencion, Control y erradicacion de la brucelosis en America Latina y el Caribe**. Martinez, Buenos Aires, Argentina. 14-16/11/1994.

JUMAS-BILAK, E. et al. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.180, n.10, p.2749-2755, 1998a.

JUMAS-BILAK, E. et al. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. **Molecular Microbiology**, Inglaterra, v. 27, p. 99-106, 1998b.

KHAN, M.Y.; MAH, M.W.; MEMISH, Z.A. Brucellosis in pregnant women. **Clinical Infectious Disease**, Estados Unidos, v.32, n.8, p.1172-1177. 2001.

KIM, J.A.; SHA, Z.; MAYFIELD, J.E. Regulation of *Brucella abortus* catalase. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.68, n.7, p.3861-3866, 2000.

KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v.16, p.65-78, 2003.

KÖHLER. S. et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.24, p.15711-15716, 2002.

LAMONTAGNE, J. et al. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. **Journal of Proteome Research**, Estados Unidos, v.6, p.1519-1929, 2007.

LAMONTAGNE, J. et al. Adaptation intracellular of *Brucella abortus*. **Journal of Proteome Research**, Estados Unidos, v.8, p.1594-1602, 2009.

LAPAQUE, N. et al. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. **Cellular Microbiology**, Inglaterra, v.8, p.197–206, 2006.

LAVIGNE, J.P. et al. The IncP island in the genome of *Brucella suis* 1330 was acquired by site-specific integration. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.73, p.7779–7783, 2005.

LE FLECHE, P. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. **BioMedCentral Microbiology**, Inglaterra, v.9, n.6, p.9-22, 2006.

LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I. *Brucella*: molecular and cellular biology. Universidade de Navarra, Pamplona. **Horizon Scientific Press**: Inglaterra, 432p. 2004.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v.16, p.75-79, 1996.

MANTUR, B.G. et al. Brucellar epididymoorchitis - reports of five cases. **Indian Journal of Medical Microbiology**, India, v.19, n.4, p.208-211. 2001.

MANTUR, B.G. et al. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 year's experience in an endemic area. **Journal of Medical Microbiology**, Inglaterra, v.55, p.897-903, 2006.

MANTUR B.G.; AMARNATH, S.K.; SHINDE, R.S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, India, v.25, n.3, p.188-202, 2007.

MANTUR, B.G. et al. Bacteremia is as unpredictable as clinical manifestations in human brucellosis. **International Journal of Infectious Diseases**, Canadá, v.12, p.303-307, 2008.

MAQUART, M. et al. Identification of novel DNA fragments and partial sequence of a genomic island specific of *Brucella pinnipidialis*. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.132, p.181-189, 2008.

MATHIAS, L. A.; MEIRELLES, R. B.; BUCHALA, F. G. Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v.27, p.18-22, 2007.

MCGILLIVERY, D. J.; WEBBER, J. J.; EDWARDS, L. D. Restriction endonuclease analysis of *Brucella abortus*. **Research in Veterinary Science**, Inglaterra, v.45, p.251-252, 1988.

MEDIAVILLA, P.S. et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.10, n.4, p.647-651, 2003.

MEINNEL, T. et al. The *Escherichia coli* fmt gene, encoding methionyl-tRNA (fmet) formyltransferase, escapes metabolic control. **Journal of bacteriology**, Estados Unidos, v.175, n.4, p.993-1000, 1993.

MICHAUX, S. et al. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.175, n.3, p.701-705, 1993.

MICHAUX, S. et al. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.179, n.10, p.3244-3249, 1997.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.90, p.209-227, 2002.

MORENO, E.; MORIYÓN, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.1, p.1-3, 2002.

NAVARRO, E.; CASAO, M.A.; SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Inglaterra, v.4, p.115-123. 2004.

NETO, J.S.F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções. **Ciência Animal Brasileira**, Brasil. suplemento 1, 2009. Palestra apresentada no VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, Belo Horizonte, MG.

NIMRI, L.F. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BioMedCentral Infectious Diseases**, Inglaterra, v.3, p.5-11, 2003.

O'HARA, M. J.; COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.10, p.425-429, 1985.

OUAHRANI, S. et al. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and number of IS6501 copies. **Journal of General Microbiology**, Inglaterra, v.139, n.12, p.3265-3273, 1993.

PAPPAS. G. et al. New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Holanda, v.26, n.2, p.101-105, 2005a.

PAPPAS. G. et al. Brucellosis. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v.352, n.22, p.2325-36, 2005b.

PAPPAS. G. et al. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Disease**, Estados Unidos, v.6, n.2, p.91-99, 2006.

PAULSEN, I.T. et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant: pathogens and symbionts. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.20, p.13148-13153, 2002.

PEI, J.; THOMAS, A.F. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.72, n.1, p.440-450, 2004.

PEI, J. et al. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.74, n.5, p.2667-2675, 2006.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.90, p.55-62, 2002.

POUILLOT, R. et al. The brucellin skin test as a toll to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. **Veterinary Research**, França, v.28, p.365-374. 1997.

RAJASHEKARA, G. et al. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.186, n.15, p. 5040-5051. 2004.

RATUSHNA, V. et al. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. **BioMed Central Microbiology**, Inglaterra, v.6, p.13-32, 2006.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.65, n.8, p.3735-3737, 1999.

ROOP, R.M. et al. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. **Molecular Microbiology**, Inglaterra, v.52, n.3, p.621-630, 2004



ROUOT, B. et al. Production of the Type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-Specific antisera. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.71, n.3, p.1075–1082, 2003.

ROUSHAN. M.R.H. et al. Efficacy of gentamicin plus doxycycline versus streptomycin plus doxycycline in the treatment of brucellosis in humans. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.42, n.8, p.1075-1080, 2006.

ROXO, E. et al. Brucelose canina. Relato de uma possível transmissão de *Brucella canis* ao homem a partir de um cadela de raça Doberman. **Boletim Informativo Controle de Zoonoses Urbanas**, v.13, p. 47-49. 1990.

SALHI, I. et al. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.71, p.4326-4332, 2003.

SANTOS NETO, L.L. et al. Abscesso esplênico por *Brucella abortus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.3, p. 53-55. 1999.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.58, p.375-382.2008.

SELEEM, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.129, p.01-14, 2008.

SOHN, A.H. et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by marine mammal *Brucella* spp. **Emerging Infectious Disease**, Estados Unidos, v.9, p.485-488, 2003.

VERGER, J.M. et al. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Inglaterra, v.35, p. 292 - 295. 1985.

VELASCO, J. et al. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.68, n.6, p.3210–3218, 2000.

VIADAS, C. et al. Construction and evaluation of a ORFeome-based *Brucella* whole-genome DNA microarray. **Microbial Pathogenesis**, Inglaterra, v.47, n.4, p.189-195. 2009.

VIZCAÍNO, N. et al. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. **Microbes and Infection**, França, v.6, n.9, p.821-834. 2004.

YOUNG, E.H. A overview of human brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.21, n.2, p.283-289. 1995

WATTAM, A.R. et al. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.191, n.11, p. 3569-3579. 2009.

WHATMORE. A.M. et al. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.43, n.2, p.761–769, 2005.

WHATMORE. A.M. et al. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.44, n.6, p.1982-1993, 2006.

WHATMORE, A.M.; PERRETT, L.L.; MAcMILLAN, A.P. Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. **BioMedCentral Microbiology**, Inglaterra, v.7, p.34-48. 2007.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** The control of neglected zoonotic disease: a route to poverty alleviation. 2006. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301_eng.pdf)>. Acesso em: 16 de Dezembro de 2009.

## APÊNDICE 1

Relação de aminoácidos: nomenclatura, símbolos e abreviações.

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccinico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

## APÊNDICE 2

Sequências brutas de DNA dos fragmentos selecionados a partir da técnica de SE-AFLP.

Fragmento	Sequência
	<b>H1-A</b>
1.1	<p>GNCTNTCTCTCATCCCCTTGGGTTTCTTAGGCATGTGCCTNTTCCCCACGCGTTTGTTCGGNCTACCACTTCTTGTGGTGCTACTGNTGCNGATGTTCTCTNTCAG            CCTTCTTTGCGCGTGGCTACGGCNCGCGGTTGCTCTGCGANCGGGTCTCGTCTGTNTATCTCCTTGGATCTTCGGTGCCGTGCCGCCGCCNGTATCGTCTCTGGA            TTGGCCGTTGCGCTCTGCGGCTTCTTGGCCCCATGCTTCTCTGGCATATGGTGACGTGACGCGTGCCGATGTGTTGACCTGCGCTGTGCTGTCGNTCTGC            AGCGCGCTCTCCNNTCCGTTCTGTTGCCGGAGCCTAATGTGCCCGANCATTGCTTTCTGACTCTTGTGATCTCTGTTGTTCCCTGGGNTGTGCTNNAACTCGT            TCTGNTCCCCGCTGGGCTCATGCGTGTGCNCGGAGGCTCCAGTGGGACTCTAGAGGGATCCACTGGTGGCTGGCAATCCTCCTGCGCGNGTATTCTCTCGA            TATGGCANNNGCCTTGCCANAGAGAGTGTACGNTGCNAACAATCACAGGANNTGTATGCACATTGCAAGTGAATTTGAAATCTNCACANTCCAATGANGGGANNANCC            CTAGGAATCGAAAANGNAGAAAACNCACNTAATNGAATAGATCTCCAATGGAGATGAATAAACCGATNATGAATATGAANGCCAGCATGAGGGACGGANAACAGA            CAAACGAAGGGAACAGTGATCAAAAAGGAGANGGAATACNNACCCGGCCAGGACGATTGCATGNANATGGCNCGCTGAAAATTAACAAGAACATNGNANACAAT            TAACCATNAGACNGTGANGNNCCATNATTGNGCCCTATGATTATCCTATGGTGACAATGAAATGNAGATAAANAAGTAGTAAAGGGAATATATAGAAANTGAAAATG            AAAATAAAATNTACCTTATAAATAAAAANGGAAAACATNAAATATAAAAAAACGATATATAATACNNCAAANCAAGANTAACAACAAAGATAAAGGANACAAAAAAGA            ANAAAAACAAGAATAACAAAACAGGANNAAGACGAAATGAAATAAAGA</p>
1.2	<p>GAGNACTACNGGGCAAAGGACAGGGGCCGGTTTTATGCATCCNGGAAGTCACTGNTGCCGGCTCAGGCTTTCAGAGGCCANGANTATTCGCGGGCTAGTGCTG            CCGGAACNTGATGACTTGGAGAGAACTGGCGAGAGGACNATGGCCGCGCGATGGATACTCATCGAGACCNCAANAGGCATCGTNACGCACACGTCCAGTGTN            TCAGGGCACCATANCACC CGCATAACCATGCAGCGNTATCTAGCACTAGCAAGAGCATCGCATTTTCCCGTGATCGNGAGCGCACATGGCNGTGCATGCCTCTAGT            ANANATNAATCAGCGACAGNCGGCNACATCCAGTACAGGAGACATATNGCGATCTAAGCAACNCCTGNTTNGTGATTTCAGATTCAGNNGGCAATATATTCATGGTGT            AGTTCAGGGCTCAANAAGAGCCANGCAAGGCANATTCAGGTGTTACGCNCTCTGGAAAGCGCTACTTGCAACAACCACCAAGTGACANTNGCAATACAAATCGCT            ATCTCTGNCGCAAGTGATCGGCACGCTTAANACAATATAGGCACTATCCAANAACTGNTTGATGAAACACANACAGAAAAGGAATAGAACCACAANACACAGATT            GGACCAGGCCACNAATGNNACAANACGGGCAGAACAAATACACACAAAANGANNAAAGCACGCGGGCAGACAGATAACGGACACANCGGATAATCCGGCCAAA            TANGGCAANAAACANCCNACATGGGCAAACACACAAGACGAGGGACTAGACCAAGAAGANAANCCACAAGCGAACATAAACCAAAAAGGGGCCATGCCAAACACAGG            GCACNAGAGGTAAAACAAAACNNGAAAACAAACNAGNAGNCACNAAATGGANACNAAGNNGGAGCACAATGAGAGAAAAAACGNAAGGTGGAGCAAAACCCAGGA            GGCAACNGCACGAAACANACNCGGACATAATGGACACCANCGCATAACCCCAATAGTAAAAAACCAAAAAGAGCGGCACCCNCCCAGNAANGCACGCCAGGAGA            CCAANAAGAACACANAGGAAGACCACAAAGAAAGNACANAN</p>
3	<p>ANAAGGCATGGGCGNATGGCCCGGGCCGGTTCATGCTCTGCATGTGCTCTGCTGCCCGTGGTGTTCGAGAGCCNTGCCTCTTCGCGGGCTCAGTGCTG            CCGTGCNTCGANGTNGNCCGCTCTGGCGGAGCCTCGGNGNNGNNGCGACAATTGGCGGCCGCCGACGAGTNAGCTNCTACACNGAGANCGCAACGAGGAACGA            GCGAAACAACNCGAGAAGACNNGCCACAANACAGAAAACATNCAGNAAATNAAAAAGACAAGGAAGAGAAAAACCAGAGAAAANAGAGANNAAGGNAGACAGAC            CACAGAAAAAANAACAGAAANANAAGAAAAAACAAAAGGAAAAAGAAAAAGANACAGAGNGACAACTCGAACCAAAAACGAGGACACAGNNGACAAAANAAA            GAACAGNACGACAAAAACANAAACCNCAACAAGAAAAGAGAAACAGAAAAACAAGANCAACAGAAAAAANAACANAGAGCGACCGAGAAANAACACAAAAAA            AGAGCACNNAACAAGANGAAAAAAAACAAAAAGAAAAACANAAAAANCAAAAATGACAACCCACAANGAAAAAANANACGNCGAACAAACAAAAAGAACAAACCC            ACGCAAAAAACACAAACNAANAACNACAAAANGCGAAAAACAAAAGAAAAACGCCACANCAGNAAAAACAAAGACANAAAAACAANGGAAANAANAACAAAAGACAA            AANCAACACANGCCAAAGGAANCAACACAACGCAACNGAGGAACAAANAANAANGAAAGNAAAAANACAGAACAAAAACANAGAAAAANAACANNAGAAAAAAG            AAANACACAAAGCAAAAAAGAAAAGAAACAANA</p>

Continuação: Sequências brutas de DNA dos fragmentos selecionados a partir da técnica de SAFLP:

<b>H1-G</b>	
4	TCTGGTCNCACATGTCCNACCCCGGTGGGTTTTTCTGCNCNTGTCGGTGTGCGGTNAGCANTCTTCTTACCCCTGTTGCGGNCCGCNCGCGGTCTGTGTCNCCC NCGTCCCTGTGGCCATTTCCGCCGCGTCACATCGGGAGCGCATCTGCTTGGGACCTGGACCTTGCACTGCGGCTCGCTCAGGAATCTTGAATCTTTTGGCCCGNGTG TACAATCCCGAGTNTCCGANAATGAACACTGTGAGAAANANNTGAGCNCAGGATCACATGATCATCAACGCNTTTATACTCGGTTNACAAATAGTGGAATTCACNNTG ATNAATATGATACGAGTATTGAAAGTTCTCAAACGGANAACCTCTGNAATATTGGATCCAATTATGTACACTATGTAACAAAGACATGNCATGTAAATAAAAAGAATAAG NGATACGCACANTTATNAATAAATNGAAATTTTTATACAAGNATGGCGGACTANCAATTTAANGGAGTGGNATCAANAATTGGCANNACCACNANGGAAAAATGTCA NCNACAATNAATGAAAATTANAGTTCAGAGGACAATAACNNGCAAAAAATGAAANCCNATTCAGGTGANAGCACTTAATTCNANCAAACNACGAAAACTNCCCATTGGA GCAGCCCTGCGGCCGNAACAATTNAAANANGCAAAGAGGGNGAAACCAATAANNACAATGAACNCAGTNNAGAAACAAATCAAGTATACNCTACGTCAANGGAANCT TTCGNAGGCACANCAATCANACAAACAACANTCAAANTAACCTCTTNANGAGACNAATGTANNGCCAATANNAANCAATTGAAGNTNANAACGTAA
8	CCGGGCGTNGGTGGATTGCCCCCTTTNGTNGTTTTATAGCAGCGAGCTGGTTTNGCCGGTGNCTGCAGGCTTCTGTTGCTTCTCCCGTCGTCATTGGTNAGCT CCTTCNNTTTGCTGAGTCGCGCCACGTGACCGTCCCGGAACTGGGTGGCGTTTTTCCGTTTCATCTGTGTCCAGGCNGTTGGTGCCGTGTGTGCTGNGCTGCCCT NTNGCAACAAAGTCGGCTGCGGTANTGTGTGGANTGCGTNCCGTCTACGCCGTCTGTCTGTCTATTTAATTGCGCTNCAAACANNGTGACNGAGTNTTACAGGAAN ANGTCAANTAAAAGAAAGACAAGTTTCGGGTCTCTAGGAACNCTCAGTGATTGTACCGTCTCGCCNACANACGNCTAGAGCAGTNATCCCACGGGCCNCTTACTACT TANGAGTTCGTAGTCCNTATTGTTTTGAATCNACTGNCACCGNTACGCGNATACCCTNGACGATTNANTAATAGGGGGGGTGTGTAGAGCATAGTCCNTTAG TGAACAGAATGTTAGAANGNCAAAGCATCCGATCATCCTTTG
9	AAGTCCCCGCGGGGGGGGTTANTTNAGCTNAGAGCAACCAGNNAGAGAGGGAAACAAACACNAACCCCCCAAGGGGGNGGGGTTTTTTAAGAAAAAGACAAA AGAAAGAGAANAGACANAACAGAGATACGAGAAACAGCCACAGACAAAACNGAAAANNAAGAGAAGAAACACAAAAAAGAGAACAGCACAGAAGCANNAAAA AAAGNAAAANAACACAATGNAAACGACCANGGGAAGGGGAGGAAACATCNAANGAACANNAGCANGGGAAACAGAACACCCACAAGANACAAGGCAGNNC AAACCGAAAGANCCGCGNAGCACCANAAGACCAANCAAGAANCCGGCNCACAAAGAGAANGGCGGGNACCAAAAATAANCNGAAAGCNAAAAAANGCCACCAG AAAACAACNAGACANCNNGAANAACNAAANNAGGANGAAAANACACAAAGCACCAGCGAAACAAACNAGACANCNNGAANAACNAAANNAGGANGAAAANACA CAAAGCACCAGCG

Continuação: Sequências brutas de DNA dos fragmentos selecionados a partir da técnica de SAFLP:

H1-C	
4	GGGAGGAGAAACCCGTCGANGTTTCGCCATCATGACTCATCCNCGCGCANAGGCCTCNCGTAATTATCCGCCTCGACCCTCATTCTGCCGATTACGNACAG AGTGAGTAACCCAACCTTATCGGACGATAGTGCACGCTCCTATCGGAGACCGTGACAGATAGGCGCNCGCNTCGACTNTNACTGCGGCCCGTGCGAAGTGCA AGGGGCATAGCGCTATTCTAGGCTACGCACGTGATAGACCGCGTCCCCGATGACTTCGCAATGCTGACGAATCATCGAGCAGACCCTACTACAGAGCTGTCTCTA CCGACCGGCAGNCGCCGCGGNGTCTCGAATNNAAGTGGCTCAGGCACATTCCCGCCTCTGGCTGTGTCGANNACGCGGCCATAATTNATTCGACGAGCCGCCAG TGGCCGAGCGACAGCTGAAGGGGTGGGATNGATTAACCAACTNCTTCATTAACGCCTCGCGTACTAGTGTGTGTCANGGGGTGCCACGAATACTACTACGTTT TTGTACTACTTGGCTCGAGTGCAGCCTGCGCTNGAGACAGGATAACGAGTGAATATCGTGGACACCTCGTTGACAGACACTCAGTACGAGCGTAAATCAAGGATC TGCGTTACAATATCTCTATCCAGCCCGTNAACCTTTGGCTCGGGCACTGGCGGCTGTGCGATTGATTCATGGCGCGGTGTCTCGGACGACGAGGGCGAAGGACCG GAAATTTGTCGCGACATGTTATCGAAGTGCAGCGCGGCGGATCCCGTTTTAGAAAGAGCAACTCCGACATTGCTCGCCGATTAGTATNCTCGAAACTGCACATTGC CTNCGGGTTCATNCTCGAGCATTAGTGCAGCTTCCCGGAATTAGCTTTTGGCCGGCCAGTGTAAACGAATTCANCCGGGGCCGGCCTTGTTACGCAATNACA TAATCGCCGTANTCATCGGACTAGGTATCTTGACCACCTTGCCAGGTAACCAAGTAAATAG
7	CGTTCCGGGCGGACCCGCGCCNCGTNGTCTTTTTATCGNACGCGAGGTTNTACGCCGCGCCTTGCTCGTGGCTANCCGGCCNCCGNNGTCTNTNGTGTGCT GTCCNTGGGCGNGGCGGNTCGACGCTNGTTCGTTGCGCGCGTGTCTCTGTCNACNGGTCGCNCGATATTCCTCGTGCTGCCGCGACACGCGTGTCCCGG GTCCGCTGCCTTTGCATATTGGCGCTGTNCGTCGCTGCGTGTGTGTCGCTTGAGCTGCTCGACGTTGCCGCGCCTTTTATANTTCTGGACCTTNTGANCTTCCAT ACCTTGGCGGGTTCNNCCCCNTATTGGGCGACTGGCTATCCACCTTANGATCGGTCCACCCTGGGGACCCNCGGACTCTGANTGGGACGCGAGNANTATCA ACANTTGCNAANAGTTACATNCGTGAACCTATTGTACANAAATACCGTAAAGGGTNAATTGAGAACGAACCANTCAAAAATATTGNCAGCAAAACGGTTACNAATTGG AGCCAGATNNTACANGGNTGTATAACGAGCANGNAACGAAAAAGATATNAGAGGCAAGACCANAGAANAATAGNGNCAANGNGAATTAGCAAAAAACTACGGGAG AAAATANATCAAAAGGAGGANCAAGNANNAACAATTATAGAAACAGAAGAAAAANTNGTNCANN
8	NANGNCGANNCCNACCANNNNAGCANACACCACCGNNAACCGACGCNACNAGCGCAGNCCNNACACNANNGNCCACGCCTCNCNNANANAGACACAGCA AAGCGNNANACAGACNNCGAAGTCCGCGCGANCNACAGCANCCGGGAAGCAGNAGAGGACANNANAGNNGANACACNACGACNNANAGNNGANCGACAAAGG NNNGGGGCGGGAGANGNGAGANAAGGNNAGACNANGAGAAAGCNAGACCAAANAGNACAANCANAACAANAATANNTCNGCTACAANACAAGATNAAAGAACTNA CAAGTAANACACGAGNTCGCACACACACGTACGCACCAGNNGGAGNANGGACGNCACTAACANNNAAGGCTAGATANAAGAAAACCGCNAGACGGACACNGCTA ATANAGACGACCGTAGGGCAGANNTTNTTNCACACGCTAACTNCCGACCAAACANACNCCGACGGCAAACAGNCACNTGAANNNCAANNTAGANAGTCACGCNC AGCAACTNCGCTGACTNCATAACAANACCCCATNCAGGGTTTTTAAAAGCGGAATNAGTAGCGACANNACAGGGNAAGGCCCCCAAT
9	GTCCCGGGGGTTTTTCAGGGGTGAGTGGCCTGTTGGCCTCCGGGGTTTTGTAGCCGTANTTNCCTCNCGTGCTGCCTATCGCAGCATTGCTGCGCGCTGCTG GGCCTAATGCATAGCGCTCCCCACGTGNGTCTNGTCTGCTCGCGTCCGTGGCTCTGNGGCGTTCCTGCCTTTCCATGCTGTCCTTTGTGATCCTTGTGTGCCACAC GCTTTGTGATCGCGCGCGCTGACTCGCNTGTGTTGTGCACCTCAGGTGCGNCCATTGCATCGGTTTGACACATCGTGCACNCGTTCCGCGCCTGACTGCCCGTGCA GCCGTGCACGTGCGCCATATTGNGCGTTTTGCAACTGCCNNGCNTCAGAACTCTANAAGGNGCCCCGCGAGGCAACTAGCCCNGCGTTGCGCCTCTATTNACN ATCACNCTCAATNAGAAAAACCTAGAAGGCGGCAAGTGNGGTTACAATCCAATANGGGGCTACAGGNCACAGTCACT
11	CTGCTTTCTTTGTGACGTCGCTGGTCACCCCTCGNGGTGGTTTTTTCGTCANCACCTGGCCTGTTTCNCGTACATGGCGGCTTTGCTGTGTTTCTGACTTGGTTT TGCTTATGCGCTCCCGTAGTGTCCGCTTCTAGTGCCTTTNCCATGTGAACCTGCCTGCGGTGGCTGGACCTGCGTCCGTGCGTTGGGCGGCGANCCCGACTCG GTGCCTTNTGTANNNTTGTATNGAGGANGANACGAGGGATTANGATGNAACGNGCTACATTCCTGCACTACACACTGGTGATGACGCACGATGTAACCTACGCA TAACGACCGCAANTCNGATTTGATATGATCTATGCATTANATGGACGAGTACNCGAGGACCCCTTAGGTTATGGTNGCTGNACCCTT

Continuação: Sequências brutas de DNA dos fragmentos selecionados a partir da técnica de SAFLP:

H1-T	
2	<p>CGNAGACTCTANGGCTAGCCCTGCCTGAGGGTTTTATGTCCCCGNATCANGCCTGCGCACCCCNNGGTGTTTTCTGTGGCTGCGACCCACCCGCNTAGCTGCT  TGGTTGNCAGCCTNNGGTCACCCCTGNCTCCTTCTGACCCGGACTGAGCGCTCGACAGTCTGTNTGGCCTGCCGGTGTACCGATGCAGGCGNTANTCGCCT  ATGCGCTGAGTACCGTGNCCCTGCTATGTGGCTCGTATCTCGCATTTAGCNTGCNGATACATGGGCGTCACGCCAGAAGCGAAACAAAANAACAGCANACCTA  CTTGCGCCCANTTAATCAAAGTAACAAACGGCGGCANTGGAGTAGCAAGATAGATATACAANCAGAGCGNNGTACACCCCTAANATAGCCTAANCNNGGAGC  AGTAACCACAATGGGNAACAACAGCGNCTGAGACNANCAAAAGCANCACACTATAGACGNACGACNNAAGTANTGTTTTTAAACCCAGNAAACAAGGCAGCNA  GAGCNGAAATAAGAAGNAAANAAANAAANAAANAAAGNACAAGAAAGAATGGNGAGAGANNNAACCNNGGAAACGTAAGGCCGNACAGACCAAAGAGAGGAC  CNATCCAAGACAGAANGAAGGNGGAGAAACAACAAAAAGAAAAAAGCCAAAGAAANAACAAACACAAACAGAGAGGAAAAAACACGGGNCACAAAGNNACA  AAANANAGCACGCACAGAACAACNAAATAANACCGACCGNNAAGGAGAACACCCGAAACGACAANNNGGAGAAANAACCCGAGTGCGCCCANTTAATCAA  AGTAACAAACGGCGGCANTGGAGTAGCAAGATAGATATACAANCAGAGCGNNGTACACCCCTAANATAGCCTAANCNNGGAGCAGTAACCACAATGGGNAACA  ACAGCGNCTGAGACNANCAAAAGCANCACACTATAGACGNACGACNNAAGTANTGTTTTTAAACCCAGNAAACAAGGCAGCNAGAGCNGAAATAAGAAGNAAA  NAAANAAANAAANAAAGNACAAGAAAGAATGGNGAGAGANNNAACCNNGGAAACGTAAGGCCGNACAGACCAAAGAGAGGACCNATCCAAGACAGAANGAAGG  NGGAGAAACAACAAAAAGAAAAAAGCCAAAGAAANAACAAACACAAACAGAGAGGAAAAAACACGGGNCACAAAGNNACAAANANAGCACGCACAGAACA  CNAATAANACCGACCGNNAAGGAGAACACCCGAAACGACAANNNGGAGAAANAACCCGAG</p>
3	<p>CGGNGGGGGCCGCATCCCCTTGGCANTCTTTTGCATCTGCCCTCTGTGCCTGAGCAGTCCCCTGCAATATGCCCTTCTTGTAGTGCTGTGTGTTGCCCTCTCT  CCTGCATGTGCGCCTGTATCTCAGCACAGTCCCATATATCTTGTGTGCGGGCATTTCGCGGGTTGCTGTGTGCGCTATTGTCTNACGTGGTTTTCCAGNTCATCT  GCGTTCGTCTCGTGCAGAGNTGGCGCGGTGTGCTTCAAGCACAATACTACATTTTCCCGTTGACNCACAGTNGCAGACACAGGTGTTCCACACAGTTACATACTG  GCGCATAAGCATAACNAAGGACGTATTGGCACGTTGTAGGTCCTTGGCAATTACTTCGGTACCGCCAATACACANTACGTAAGCCATATACGNTTACGTAGTTT  AGCTTCCAAGACTCCTAGTTTTACGATGCCGTGCATTCCCCCGATTCTTGAATCCAGCTACAGCAAATATNATACACACATGAGTTCTAGCACAGGAGCCCACT  TCAATTAGAAGTTATGACAGTATGCGANGAGGCTCAAGTGTNGCAACACAACAGGAATATGGGGAGCCTGANTCAGTGGACTATGNTGTAGNCAATTCGCCATA  TTTTCTCCGCCAATACGGGCGACGGCCNCATCAATAANNTGGTNGCCATGCAATNCCCCGGCCACNGCGGACANGGAGGCAANAACANTGACNACAATCNTGCC  GAATGGNCAAGAATTGAGGTCAGTTGGTANCCACAGAACAATANCAATACCAACGCNGCTGGTTATAAACCAATCNAGATAAGAAGTCNTACGAAAAGAATCA  GTCAATTNAANACGGGGCNCCTGGGCATNCAAAGATTTGCACACCTGGTGTGGCCATGNCNTAGCGGNGNGCGCCACTACGGAGNTTCCCCATTTATATACAGAG  CTCGGTNGACACCANCACAAAGCCACAAAGACTAATTTCAATAGNTACCCCAANAATTCCCGNAAGAAAGAAATCAACCAACACANANNNAAGCAGGAGGA  CCACCAATGGGCAACGAAACAAAATAGAAGACCACATAGTAGGAGGGACCAGCAAATGTANATGGATAGAGATAGNACAAAAACTNACACNACAGGGG  GAAAGGANACAAACAGGTAACAGGAGAATACCANNGACACACCACAAAGAGAAACAATCGGCGGAAGNACNCCAGGAGTAGGAN</p>
4	<p>CNAANNAACCNAGGGGNACCTGCCCTGCGCTCTGGCCCTGGTGGTTCCACGGGTTGGNGCTACACTGNGCCTGCTCTGTTTCGCCATTGCTGACCCGG  ACTCGGGCCACCGTGTGACTGGTACATCACACGTGNGCCGGCGCGATGCCGNGCCNGACGACACACCGCTGGGCTGGCAGGTGGACGGGAACAGNGAAG  GGACTGCGGGGAGGACGANNGACNCGGGACGAGCAGNCCCCGGGANNCNGTNGAGTACGAAAAGAGAGCAAANACCCANAGAACAAACAAACAGNAAACAC  ACAAGACNACACACTGACCAAGAGCCNCCGTGACCCGCGACTAGACGNANACGACGNAANAAGACANACAACACAGGAGACGAACATGAAGCACCAAGAA  ANGAGCGGACAAACAGAGAAACAAACNNGGANCCANTCCACCACTGGCCCCCACAGGCAAAATCAAAGACGANNGCGCANGAAACGGGNCACAGCA  NAGCAGNACACACANGCCCCNACACNACANNANACAACGCATGNCANCAGACGNAACACAACAGAAAAAGANNCGAGNACCAGAACCAANACAAANACAG  ACNAAACCACAACACAAANCNACNACCNCNGGACACACAAGAAANATAANAGCACNCCAGAANNCGAAGAAACACAAAAACANGAACAAACAGCCCAANCAAACT  CNACNCGGAANANACAGCNCACACACANGAAACNAAANACAAAAAACACAAACACACCAANACAAANANACAAAAAGCGCCACCCCNCCNACCAACCCCA  AACGCCACCAACACAGCCNNGGNCNCCAAACANCAAAAAACAGAAAGNAAAAACNAACGAAAAACAGACNCAAAAAACAAACCCACNANACACCACAAANAA  AAACACAAACAAACANAANACCAACCCAGCANCGCGGGGACNCCCAANACACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAAC  AGNACNACGCACNAAANACGANANACCACCANANACCAAAACACCAGAAAGAAAGCCAAAAAAGAAACATCAAANCAAC</p>

Continuação: Sequências brutas de DNA dos fragmentos selecionados a partir da técnica de SAFLP:

- 5 AAAACAAAAACAAAAATAACANAAAAAACAAGGAAGCNATGTGCGCGATGAGCAGGATCAGGCCCTGCATGGATTTAGNGANCATGTCCGGTGCACCT  
GGTNCCTCGAAGGAGNCAGTTTACNCAGTGATTTCGACGCGATGTATGACATGCCNAAATAGCAGTNATGNAAGCAAAAANAAAGAGATNACTACATTGCANANACCN  
NGNGAGNCAAATAAATNAANATTTGTGAGATGTGNTAGTNTAGTTCGCTAGCNCACGGCAGATCAAATCTGTTTTCCACCTACCTGTGGCANNCTCGTGACAN  
TTGANNTCGCACNNNTATCATCAGACTTGAGCTGAGTNTACATCAGTTAGTANTCTACTAGACGAGCATTGACAAATTGTCAAGACCAAAACCTGTTACNAGN  
NGGNGATGAAANAAAAAGANNNTCCNGAGGANCTAGTGAATGAAATAANTTAACAGTNATGNCAGAAATTCTCAATNTCGGAANNNAGATGANNAAGACNAGN  
NCNAAATTCCATTGANGTTCAANANCTCTCNTCCGATTGGTTNAACGTTGGAAGTATTCTAACGACANCATACNCGACGAGTTGATACCCCGGAGTNNAGNGA  
ANAAGCATATTTAATTANTTAGTANATACGAAATATAATGNTGGTATTAACAANANAATCATTTAATATGGGNTAAAACCAGTTCAATAAAGACAACATATATTN  
ANCTTATTAANNATCTCAGGAATGACTCCAAAGATNTNGTAAAAAATCACCGANTGTACACAAAATATANTTNAGNAAGATACCCCGGAGTNNAGNGAANAAGCA  
TATTTAATTANTTAGTANATACGAAATATAATGNTGGTATTAACAANANAATCATTTAATATGGGNTAAAACCAGTTCAATAAAGACAACATATATTNANCTTATT  
AAANNATCTCAGGAATGACTCCAAAGATNTNGTAAAAAATCACCGANTGTACACAAAATATANTTNAGNAA
- 6 CGNAGAACAAAACACGAACAGANAANCAGACAAGAGANANGGCACAATGCGGCAACAGGCAAAGATACACACACCCACGACACATNAGNANCACAAGAGCCC  
GGGGTNTTAACCCGNACTGAGAGGANNANAACGACCCCAAGGATGGTAACCCAGAACANAAGACCAGAACCNAGCAGNACAACACANAACAAAAAACAG  
AANNACNGCCGAGNCCCCACGGCCGCGGNCGCCACANCNTCNAAGCNCANACCCACCCACGAAGAGNGGGNAGNAAACGCAAACAGAGACNCAGNGN  
ACNAGGCCNCGCCACNGCCNCGAGAGAGGCAGAGACACCGCACAAACCACAGANCGAAANAAGNCCCAANANCCCCAGCGCCCCACAGACCAACN  
ACAGCCCGACGCANACANGACCAACGANACANNNCGAANNNACCACCCNCCACACACCCGNNCNGAAACGACACGCNCCCACGNAGCNACCACCCANCAC  
CAGAAAGAGCGCACCCNAACACAGGAAAACNNGNAAAGCACACAANACGAACCCNANNNACCANCNAACGNAGGACGCGCAGCCCGCCAGCAGCCNCGC  
CCCCGCGGACNNCCACGCANAACGGCNAACCGNANNAGCCACAAAANNAGCGAAGGGGGAAANAAANACNGAAGAAACNNGAGACGACGAAGGNGNA  
ACAAGCGACGAGNGGGAGAGAAACCNGGAGGANGAACCAAAAACGCCNAAANGAANGCAAGAGCNAGGGAGCGNGCNCNCCGACACGCCCCCCC  
NCCACACAACAACNCAACANACANNCACTGCNANAGNGNA
- 8 ACACAAAACAAAACCAACAAACAAATAAAAAAACAANACAAAAAGNGAGGAGGTGAGTGAATATAGTGAAAAAAGTCCCGTNGGGGTTTTTTGTAGGTAT  
AGTGTAGCTAGTCANTAGTNGTCCCCGGTACACCAAGTTTTTTTAGGACAAGTGTGCAACACACCCNGNAANAAGTAGTCAACAGTAGNNTGTNNGTATAAGTACAN  
ANANGGTAGTACACNGAAATAGAAAAGNAAAGTNACCCGCTNTCCGACAAAANATGTCAGGTGTGATNCGCNTNTAGTNCGGTGTAAACGNTTGTATNAAGTTAN  
GATAATGTATTAATAAGTGTNNGTANNNAAGCANNNCAACANCTGTTNGNTACTTCTACTCCGTTCACTCCTACTNCANNNCACCCNANCCTCACCCNCCACANA  
AATGCAAAATCATTNACCTACTTNAANCCAGACCCGTTNTCCACCACAGTCTTNTCANNGTTCATACNAANCAAGTTNCCGACACAAAAANNCAATNNCATCACA  
NCATNTCCAACNTCACANACAAAAANAAGAAGNACNANANACNGCAGCAACCCANCAACCCANNCNAAACANAAAANNAGNNACACACCACNGCGCACC  
CCNGGGGCNANNGACC
- 9 GTCGCTTTCGCTGCGCCNCGGTTTTATTCTTGTGCNGATGTCGCAACCCTGGCGTTTCGGCCCTCTCTCCGGGGCGGCTCGCCCGTCTTNCATTGGCCTCTGG  
GCGTGTCTCNCGTCTCTCGTTCCCTGGGTTNGGCAGTGGCCGCTGTTTGCATGACCGTGTCTGGCACGCGCCGTCTATCTCCCGTATGTGCTCNTNAGCCNGTG  
CCGTAGTCAGTGTCTCCCGCAGGGTGACCGCGCTNACTATGCCCTTGGCTCGATCGGTACGCTNACTGTCTGANCTTGGTTCTATATATTAGGCCGAGTCCGTG  
CCTTGCCTGACANTCCTAATNCNGCGACCCGTCCTCAGAGGCACACGATCTGGCATCGTTGCGCACGTTACNNCAATAAGTNCAGGTCCGAAACGGGCGGGG  
AAATNGCCAAATTACCCAANAAGGAATGCCNTGAAGATACACGCCATAAAGGAACAGAATTAATGNAGTACGAAGAAGAGCCACCGGATAATTATAGTGGCT  
ATGGGCTAGCGGNATGTTCTCTGGCACAAAGCC
- 10 TGTGTGCGCTCCCTGNGTGTTCGTTGCGGATTGCCGTGCTGTGCTGCTTCCGCTCGTGCCNGACGCAGTGNCGCTAGTCTGGTTCGCACCTACTTCATNG  
CGNGGCTCGTGCTNAGTCCATTGGGCCGNGCTCCCNCGGTCTNCTCGGGGACTCGTTGCGACGCTTCCGCTNTGTTGCCGGTTCTCCTTCTGGCCTCT  
GTGCGGGCTTGNNGTGCTGTTTGTCTTGGACCTTCTTCTTCTCCTTNCCTGGGCATTGTATCANAGATATAANTGCATCNAAGACCAATCGCTAATC  
CGGGAATGCAGCTCCTACTCCTTATAGGAAGGACNTCAGTCCGTATATCATTGGAGCTCCGGCTATGCAAAGGAGGNATAGTCTGCGCGCCNATANAGGTC  
TCGCGTTGAAGAAAGCTCTTGCTNCGATCCAACA
-



