

JAQUELINE SILVANA MOREIRA

**Purificação de substâncias antibacterianas e estudo de plasmídios
colicinogênicos de *Shigella sonnei***

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

BELO HORIZONTE

2018

Jaqueline Silvana Moreira

Purificação de substâncias antibacterianas e estudo de plasmídios colicinogênicos de *Shigella sonnei*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Luiz de Macêdo Farias

Coorientadoras: Prof.^a Paula Prazeres Magalhães

Prof.^a Regina Maria Nardi Drummond

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2018

043 Moreira, Jaqueline Silvana.
Purificação de substâncias antibacterianas e estudo de plasmídios colicinogênicos de *Shigella sonnei* [manuscrito] / Jaqueline Silvana Moreira. – 2018.

188 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Luiz de Macêdo Farias. Coorientadoras: Prof.^a Paula Prazeres Magalhães, Prof.^a Regina Maria Nardi Drummond.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Shigella sonnei*. 3. Bacteriocinas. 4. Plasmídeos de Bacteriocinas. I. Farias, Luiz de Macêdo. II. Magalhães, Paula Prazeres. III. Drummond, Regina Maria Nardi. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579

COLABORAÇÃO

Jamil Silvano de Oliveira

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG

Marcelo Porto Benquerer

EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF

Márcia Helena Borges

Fundação Ezequiel Dias, MG

Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG

Thiago Mafra Batista

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Jaqueline Silvana Moreira
Nº REGISTRO: 2014767810

Às 8:00 horas do dia 05 de outubro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Daniel Moreira dos Santos (Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento/Serviço de Proteômica e Aracnídeos/Funed), Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Lívia Tereza de Andrade Souza (Centro de Desenvolvimento, Inovação e Tecnologia/Labtest e Centro de Ensino Superior/Conselheiro Lafaiete), Vera Lúcia dos Santos (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e o Prof. Luiz de Macêdo Farias - Orientador, para julgar o trabalho final, da aluna **Jaqueline Silvana Moreira**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de outubro de 2018.

Dr. Daniel Moreira dos Santos Daniel Moreira dos Santos
Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli J. R. Nicoli
Profa. Dra. Lívia Tereza de Andrade Souza Livia Tereza de Andrade Souza
Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos Vera Lucia dos Santos
Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias (Orientador) Luiz de Macêdo Farias

Flávio Guimarães da Fonseca
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Aos meus pais, Nerza Alves dos Santos e Afonso Moreira dos Santos, por serem a razão da minha existência, e ao meu Marido, Jamil Silvano de Oliveira, amor da minha vida, meu tudo.

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada. Provavelmente, eu não conseguirei expressar toda a minha gratidão por meio de palavras...

A Meu Senhor Deus, Jesus, Maria e José, eu agradeço, por me carregarem no colo em todos os momentos da minha vida e por toda misericórdia. Por me mostrarem o caminho, me darem muita luz, sabedoria e discernimento. Agradeço por tudo que sou, pela minha família e por todas as oportunidades. Agradeço por mais esta conquista que tanto almejei. Também agradeço aos Santos e anjos por todas as intercessões.

Aos meus pais, Nerza Alves dos Santos e Afonso Moreira dos Santos, exemplo de vida, de amor! Obrigada por tudo o que vocês me proporcionam, não tenho palavras para agradecê-los e expressar o amor que sinto por vocês! Mãe, obrigada pelas suas orações, pai pelo carinho!

Meu doce e querido maridinho, não tenho palavras para agradecer a você! Tudo o que eu falar, ainda será pouco. Você é um presente de Deus na minha vida! Obrigada por fazer parte desse sonho! Pela sua participação ativa neste trabalho, principalmente, nos processos de purificação. Pelo carinho, companheirismo e amor. Sou muito feliz ao seu lado!

Ao meu orientador, Professor Luiz Macêdo, obrigada pela grande oportunidade de trabalhar com pesquisa, pelos ensinamentos, por contribuir para a minha formação e por ser tão generoso. Obrigada pela acolhida durante todos esses anos no Laboratório MOA.

À minha coorientadora, Professora Paula Magalhães, pessoa muito competente. Obrigada pelos ensinamentos, pela acolhida no Laboratório MOA e por ser tão prestativa. Obrigada por contribuir para a minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, Professora Regina Nardi, sempre tão gentil e amável! Obrigada pelos ensinamentos, por contribuir para a minha formação acadêmica e pela disponibilidade em me ajudar.

À professora Simone Gonçalves, pela contribuição para a minha formação profissional, pelos conselhos e conversas agradáveis.

Ao pesquisador Marcelo Bemquerer, muito obrigada por todos os ensinamentos sobre espectrometria de massas, pela sua disponibilidade em me ajudar com as análises dos meus materiais e por ser tão solícito.

À pesquisadora Márcia Borges e à bióloga Jaqueline Leal, pessoas prestativas, agradeço pela ajuda nas análises dos meus materiais.

À professora Mariana Quezado, obrigada pelo apoio, pelas dicas e ensinamentos, por ministrar aulas tão interessantes e pela disponibilidade em me ajudar.

Ao pesquisador Tiago Mafra, por me ajudar com os experimentos de sequenciamento do DNA extracromossômico.

Às minhas alunas de Iniciação Científica, minhas filhinhas, Desielle Clementino e Maria Gabriela Morato, obrigada pelas ajudas ao longo desse doutorado!

Ao meus irmãos, Celso, Lúcio, Toninho e Leley, minhas cunhadas Rosa, Maria e Cristiane, meus sobrinhos Any Shirley, Carolina, Anselmo, Stephany, Larissa, Manuela, Rafaela e meus afilhados e sobrinhos Vitor e Luiz Afonso. A vida com vocês é mais doce. Família é tudo! Amo vocês!

A minha amiga e irmã de coração, Alícia. Obrigada por todos esses 20 anos de amizade e companheirismo. Pelo ombro amigo e por sempre me ajudar! Também agradeço ao Kiko e aos meus afilhados, Ana Luiza e João Victor.

A todos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Laboratório Nanobiotecnologia e Sinalização Celular, Laboratório Biologia Estrutural - Bioest, Laboratório de Proteômica (Centro de Laboratórios Multiusuários), Laboratório de Venenos e Toxinas Animais e equipe iGEM UFMG/Brasil, todos ICB/UFMG, pelos reagentes e equipamentos cedidos, pela amizade, pelas conversas agradáveis, por tudo que aprendi e por todas as ajudas. Sou extremamente grata a cada um de vocês! Em especial, Adriana Raabe, Anderson Santos, Bruno Santos, Debora Costa, Fernandes Tenório, João Fernando Gonçalves, Joaquim Texeira, Mariana Costa, Natália Guimarães, Rebecca Medeiros, Ricardo Cambraia, Swiany Lima e Thaysa Tagliaferri.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pelas considerações que, certamente, serão de grande importância.

Ao Departamento de Pós-graduação em Microbiologia do ICB/UFMG, em especial aos professores, por todo o conhecimento que eu adquiri ao longo desses anos.

**“A persistência é o caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)**

“Jamais considere seus estudos uma obrigação, mas uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertence.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE QUADRO	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxiv

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	O GÊNERO <i>Shigella</i>	25
1.1.1	SHIGELOSE	25
1.2	PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS	29
1.2.1	HISTÓRICO	29
1.2.2	MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	31
1.2.3	MOLÉCULAS MULTIFUNCIONAIS	33
1.3	BACTERIOCINAS	34
1.3.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	34
1.3.2	BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS	36
1.3.3	BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS	38
1.3.3.1	COLICINAS E BACTERIOCINAS TIPO COLICINA	39
1.3.3.2	MICROCINAS	40
1.3.4	BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR ARCHAEA	43
1.4	APLICABILIDADE DAS BACTERIOCINAS	44

1.4.1	BACTERIOCINAS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	44
1.4.2	BACTERIOCINAS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL	46
2	JUSTIFICATIVA	49
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS	51
4.2	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO INTRACELULAR	51
4.2.1	DIÁLISE DOS EXTRATOS PROTEICOS INTRACELULARES	52
4.2.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS EXTRATOS C-30 E C-75	53
4.2.3	TITULAÇÃO DOS EXTRATOS C-30 E C-75 ATIVOS	53
4.2.4	DOSAGEM PROTEICA	53
4.2.5	ATIVIDADE ESPECÍFICA	54
4.3	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75	54
4.3.1	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA	55
4.3.2	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	55
4.3.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCO	56
4.3.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SEPHASIL™ PEPTIDE	56
4.3.5	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE AFINIDADE HEPARINA	57
4.3.6	SS12 EMPREGADA COMO MATRIZ DE AFINIDADE	57
4.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	58
4.5	REDUÇÃO, ALQUILAÇÃO E TRIPSINÓLISE DAS AMOSTRAS PURIFICADAS.	59
4.6	SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS	59

4.7	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO DNA EXTRACROMOSSÔMICO DE <i>S. sonnei</i>	60
4.7.1	EXTRAÇÃO DE DNA	60
4.7.2	PRODUÇÃO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO	60
4.7.3	PRÉ- PROCESSAMENTO E MONTAGEM DOS CONTIGS	61
4.7.4	ANÁLISE DOS DADOS	61
4.8	BUSCA POR COLICINAS SINTETIZADAS POR <i>S. sonnei</i>	62
4.8.1	SDS-PAGE	62
4.8.2	GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO <i>IN SITU</i>	62
4.9	CONJUGAÇÃO E ANÁLISE DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	63
4.9.1	ESCOLHA DE AMOSTRA RECEPTORA	63
4.9.2	ANTIBIOGRAMA	64
4.9.3	CONJUGAÇÃO	65
4.9.4	CONFIRMAÇÃO DO RESULTADO DA CONJUGAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA	66
4.9.5	EXTRAÇÃO DE DNA EXTRACROMOSSÔMICO E ELETROFORESE	66
4.9.6	CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA DE UMA AMOSTRA TRANSCONJUGANTE	67
4.9.7	SDS-PAGE	68
4.9.8	GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO <i>IN SITU</i>	68
4.10	TRANSFORMAÇÃO	69
4.10.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS ELETROCOMPETENTES	69
4.10.2	TRANSFORMAÇÃO	70
4.10.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA PELAS CÉLULAS TRANSFORMADAS	70
4.10.4	PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDIOS COLICINOGENICOS	71

4.10.5	TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO OS PLASMÍDIOS COLICINOGÊNICOS ISOLADOS, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E ANTIBIOGRAMA	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO PROTEICA, TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA, DOSAGEM PROTEICA E ATIVIDADE ESPECÍFICA	73
5.2	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75	73
5.2.1	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA	73
5.2.2	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	74
5.2.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCO	77
5.2.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SEPHASIL™ PEPTIDE	77
5.2.5	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE AFINIDADE HEPARINA	78
5.2.6	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA	78
5.2.7	SS12 EMPREGADA COMO MATRIZ DE AFINIDADE	78
5.3	ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SEQUENCIAMENTO	79
5.4	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO DNA EXTRACROMOSSÔMICO DE <i>S. sonnei</i>	101
5.4.1	EXTRAÇÃO DE DNA	101
5.4.2	SEQUENCIAMENTO DO DNA EXTRACROMOSSÔMICO ISOLADO DE <i>S. SONNEI</i> SS9	102
5.4.3	ANOTAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DOS CONTIGS	103
5.5.	BUSCA POR COLICINAS SINTETIZADAS POR <i>S. sonnei</i>	105
5.5.1	SDS-PAGE	105
5.5.2	GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO <i>IN SITU</i>	105
5.6	CONJUGAÇÃO E ANÁLISES DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	108
5.6.1	ESCOLHA DE AMOSTRA RECEPTORA	108
5.6.2	ANTIBIOGRAMA	109

5.6.3	CONJUGAÇÃO	109
5.6.4	ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS CÉLULAS TRANSCONJUGANTES	110
5.6.5	ELETROFORESE	110
5.6.6	CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA DE UMA AMOSTRA TRANSCONJUGANTE	112
5.6.7	SDS-PAGE	114
5.6.8	GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO <i>IN SITU</i>	114
5.7	TRANSFORMAÇÃO	117
5.7.1	ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS AMOSTRAS ELETROCOMPETENTES	117
5.7.2	TRANSFORMAÇÃO	117
5.7.3	ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS AMOSTRAS TRANSFORMANTES	118
5.7.4	TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO OS PLASMÍDIOS COLICINOGÊNICOS ISOLADOS, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E ANTIBIOGRAMA	119
6	SINTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	123
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
8	APÊNDICE I	144
9	APÊNDICE II	180

LISTA DE QUADRO

1	Avaliação da atividade antagonista e da susceptibilidade celular frente à substância antagonista para a seleção de uma amostra receptora para o teste de conjugação	64
---	---	----

LISTA DE TABELAS

1	Volume, titulação da atividade antagonista, atividade total, dosagem proteica, proteína total e atividade específica dos extratos C-30 e C-75 e das frações e do <i>pools</i> das frações parcialmente purificadas produzidas por <i>Shigella sonnei</i> SS9	76
2	Purificação por processos cromatográficos do extrato proteico intracelular precipitado a 75% de sulfato de amônio e análise por espectrometria de massas das frações purificadas e parcialmente purificadas.	87
3	Identificação por espectrometria de massas e banco de dados <i>Genbank</i> ferramenta <i>Protein BLAST</i> das substâncias antibacteriana purificadas	91
4	Purificação por processos cromatográficos do extrato proteico intracelular precipitado a 75% de sulfato de amônio e análise por espectrometria de massas das frações purificadas e parcialmente purificadas.	92
5	Purificação parcial de substâncias antagonista utilizando SS12 como uma matriz de afinidade, cromatografia em coluna de fase reversa e análise por espectrometria de massas	93
6	Avaliação da atividade antagonista e da susceptibilidade celular frente à substância antagonista para a seleção de uma amostra receptora para o teste de conjugação	108
	APÊNDICE II	180

LISTA DE FIGURAS

1	Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Mono Q™ da fração intracelular C-75 de <i>Shigella sonnei</i> SS9 precipitada a 75% de sulfato de amônio.	74
2	Perfil cromatográfico do <i>pool</i> / TI em coluna de exclusão molecular Superose 12 HR 10/30.	75
3	Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.	81
4	Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.	82
5	Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.	83
6	Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.	84
7	Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.	85
8	Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.	86

9	Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de <i>S. sonnei</i> .	94
10	Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de <i>S. sonnei</i> .	95
11	Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de <i>S. sonnei</i> .	96
12	Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de <i>S. sonnei</i> .	97
13	Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de <i>S. sonnei</i> .	98
14	Perfil de fragmentação da proteína fator de promoção da hibernação ribossômica de <i>S. sonnei</i>	99
15	Perfil do DNA extracromossômico de <i>S. sonnei</i> produtora de substância antagonista.	102
16	Gel de poliacrilamida corado por prata.	106
17	Gel de poliacrilamida revelado <i>in situ</i> .	107
18	Atividade antagonista de amostras transconjugantes.	110

19	Perfil plasmidial das amostras produtora, reveladora e transconjugantes.	111
20	Curva de crescimento bacteriano e produção de substância(s) antagonista(s).	113
21	Produção de substância(s) antagonista(s) sintetizada pelo transconjugante 9 durante a curva de crescimento bacteriano.	113
22	Perfil proteico da amostra transconjugante 9 em SDS-PAGE	115
23	Perfil antagonista da amostra transconjugante 9 em gel de poliacrilamida 12,5% revelado <i>in situ</i> .	116
24	Avaliação da atividade antagonista da amostra de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada com o DNA extracromossômico de <i>S. sonnei</i> SS9 contra <i>S. sonnei</i> SS12.	118
25	Avaliação da atividade antagonista dos transformantes <i>E. coli</i> BL21 (DE3) contendo o plasmídio colicinogênico 2, originado de <i>S. sonnei</i> SS9, contra <i>S. sonnei</i> SS12.	118
26	Avaliação da atividade antagonista dos transformantes <i>E. coli</i> BL21 (DE3) contendo o plasmídio colicinogênico 3, originado de <i>S. sonnei</i> SS9, contra <i>S. sonnei</i> SS12.	121

27	Antibiograma das amostras <i>Shigella sonnei</i> SS9 e transformantes contendo os plasmídios colicinogênicos 2 e 3.	122
----	---	-----

	APÊNDICE I	144
--	-------------------	-----

5

10

15

20

25

30

35

40

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Cassete de ligação a ATP
AF	<i>Pool</i> das frações obtidas da cromatografia em coluna de afinidade
AAMP	Peptídeos antimicrobianos aniônicos
AMP	Peptídeo antimicrobiano
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
BtuB	Receptor para vitamina B12
Ca ²⁺	Cálcio divalente
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Co ²⁺	Cobalto divalente
CP	Controle positivo
C-30	Extrato proteico intracelular precipitado com 30% de sulfato de amônio
C-75	Extrato proteico intracelular precipitado com 75% de sulfato de amônio
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FR	<i>Pool</i> das frações obtidas da cromatografia em coluna de fase

	reversa
FT	Filtrado obtido após preparação em cartucho Sep-Pak C-18
g	Força gravitacional
GEMS	<i>Global Enteric Multicenter Study</i>
GF	<i>Pool</i> das frações obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ISD	<i>In-Source Decay</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Lac	Lactose
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
Mcc	Microcina
Mg ²⁺	Magnésio divalente
Mn ²⁺	Manganês divalente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NaCl	Cloreto de sódio
Ni ²⁺	Níquel divalente
NT	Não testado
ORF	Fase de leitura aberta
OMS	Organização Mundial de Saúde

P	Padrão de massa molecular
Pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
Prod	Amostra produtora de substância antagonista
p/v	Peso/volume
Rec	Amostra receptora de plasmídio
RNA	Ácido ribonucleico
RpL1	Proteína ribossomal L1
rpm	Rotação por minuto
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SS9	<i>Shigella sonnei</i> produtora de substância antagonista
SS12	<i>Shigella sonnei</i> sensível a expressão antagonista
T	Testado
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TI	<i>Pool</i> das frações obtidas da cromatografia em coluna de troca iônica
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UA	Unidade arbitrária de bacteriocina
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
Zn ²⁺	Zinco divalente

RESUMO

Shigella é agente etiológico da shigelose, doença que apresenta padrão de disseminação mundial, com cerca de 165 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente 1 milhão óbitos/ano, a maioria, crianças de países em desenvolvimento. Peptídios e ou proteínas antimicrobianas são substâncias biologicamente ativas, produzidas por organismos procariotos e eucariotos. A expressão dessas substâncias confere ao organismo produtor uma linha de defesa contra patógenos, ou ainda, vantagem competitiva para os microrganismos produtores.

O nosso grupo de pesquisa vem investigando a produção de peptídios e ou proteínas antimicrobianas, em especial, bacteriocinas. O objetivo geral do trabalho foi isolar e identificar substâncias antibacterianas e avaliar a presença de plasmídios colicinogênicos em uma amostra de *Shigella sonnei*. Para purificação e identificação, as biomoléculas foram extraídas por precipitação proteica da fração intracelular com 30-75% p/v de sulfato de amônio (C-75), purificadas por processos cromatográficos, avaliadas quanto à ação antagonista contra um outro isolado da mesma espécie, analisadas em relação à pureza e sequência dos resíduos de aminoácidos por espectrometria de massas e classificadas com base nas sequências de aminoácidos disponíveis em bancos de dados. A identificação dos plasmídios colicinogênicos foi realizada pela extração do DNA extracromossômico, construção das bibliotecas de DNA, análise em sequenciador de nova geração, identificação das ORFs por comparação em bancos de dados, transferência dos plasmídios colicinogênicos por conjugação e transformação, confirmação da ação antagonistas produzidas pelos isolados transconjugantes e transformantes e análises em gel de poli(acrilamida). Os ensaios de purificação e sequenciamento identificaram sete substâncias antibacterianas e, dentre essas, uma proteína tipo histona e uma proteína fator de hibernação ribossômica. O sequenciamento genético identificou a presença de dois plasmídios colicinogênicos, codificadores de uma colicina com massa molecular 61,2kDa e da colicina E1. Os dados demonstram que *S. sonnei* produz diversas substâncias bioativas que podem auxiliá-la nos processos de infecção, colonização e obtenção de nutrientes.

Palavras-chave: *Shigella sonnei*, peptídios e proteínas antimicrobianas, bacteriocinas, plasmídios colicinogênicos.

ABSTRACT

Shigella is the etiological agent of shigellosis a worldwide distributed severe type of inflammatory diarrhea. The disease affects about 165 million people and it is responsible for nearly 1 million deaths mainly of children from developing countries each year. Antimicrobial peptides and/or proteins are biologically active substances, produced by prokaryotes and eukaryotes. The expression of these substances may contribute to the defense of the producer organism against pathogens and may also represent a competitive advantage to it. Our research group investigates the production of antimicrobial peptides and/or proteins, in special, bacteriocins. The aim of this investigation was to isolate and identify antibacterial substances and to evaluate the presence of colicinogenic plasmids in a sample of *Shigella sonnei*. For purification and identification, the biomolecules were extracted from the intracellular fraction by protein precipitation employing ammonium sulfate 30-75 % (C-75), purified by sequential chromatographic steps, evaluated about antagonistic action against another isolate of the same species, analyzed for purity, and sequenced by mass spectrometry and compared with available in databases. The identification of the colicinogenic plasmids was performed by extracromossomic DNA extraction, construction of DNA libraries, next-generation sequencer analysis, identification of the ORFs for comparison in databases, transfer of the colicinogenic plasmids by conjugation and transformation, confirmation of the antagonistic action produced by the transconjugant and transformant isolates and polyacrylamide gel analyzes. Purification and sequencing assays identified seven antibacterial substances and among them a histone-like protein and a ribosomal hibernation factor protein. Genetic sequencing identified the presence of two colicinogenic plasmids, encoding a colicin with a molecular mass of 61.2kDa and colicin E1. The data show that *S. sonnei* produces several bioactive substances that can aid in the processes of infection, colonization and nutrients.

Keywords: *Shigella sonnei*, antimicrobial peptides and proteins, bacteriocins, colicinogenic plasmids.

1 INTRODUÇÃO

5 1.1 O GÊNERO *Shigella*

O gênero *Shigella* está incluído no filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família *Enterobacteriaceae*. Ele é constituído por bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, não capsulados e incapazes de fermentar a lactose (World Health Organization, 1999; Jennison & Verma; 2004; Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Vinh *et al.*, 2009; Marteyn *et al.*, 2012). As espécies do gênero, quais sejam *S. sonnei* (1 sorotipo), *S. flexneri* (6 sorotipos), *S. dysenteriae* (15 sorotipos) e *S. boydii* (20 sorotipos), podem ser distinguidas com base em provas bioquímicas e sorológicas (Puzari *et al.*, 2018). Os sorotipos são identificados com base em variações do antígeno O, que é componente do lipopolissacarídeo presente na membrana externa da bactéria. (World Health Organization, 1999; Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Vinh *et al.*, 2009; Marteyn *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; Sethuve *et al.*, 2017).

20

1.1.1 SHIGELOSE

25 *Shigella* é o agente etiológico da shigelose, também conhecida como disenteria bacilar, que apresenta padrão de disseminação mundial, com cerca de 165 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente um milhão óbitos/ano, a maioria, crianças (Joh *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014; Sethuve *et al.*, 2017; González-Torralba *et al.*, 2018; McCrickard *et al.*, 2018). Entre as espécies de *Shigella*, observa-se predomínio de *S. sonnei* e *S. flexneri*. *Shigella dysenteriae* tipo 1, capaz de produzir a citotoxina shiga, responsável por quadros de síndrome hemolítica urêmica, está associada a casos mais graves da doença. A bactéria é mais frequentemente isolada no sul do Saara e no sul da Ásia. Relatos de shigelose causada por *S. boydii* são raros, restritos,

30

em especial, ao subcontinente indiano (Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonrtti, 2007; Nunes *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013).

Historicamente, *S. sonnei* é isolada com maior frequência em países industrializados e *S. flexneri* representa a espécie mais comumente observada em países em desenvolvimento. Diversos relatos apontam aumento da frequência de *S. sonnei* paralelamente ao desenvolvimento econômico de regiões específicas de países menos desenvolvidos (Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Holt *et al.*, 2012; Nygren *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2016; Duggan & Mostowy, 2018).

Esta distribuição heterogênea de *S. sonnei* e *S. flexneri* associada ao grau de desenvolvimento ainda não está completamente esclarecida. Entretanto, o aumento da prevalência de *S. sonnei* em regiões mais industrializadas de países em desenvolvimento pode ser explicada, em parte, pelo fato de que o LPS de *Plesiomonas shigelloides* sorotipo 17, membro da microbiota intestinal de peixes e comumente encontrada em águas não tratadas de ambientes tropicais de países em desenvolvimento, é idêntico ao LPS de *S. sonnei*. Nestas regiões, é comum a ingestão deste tipo de água por parte da população, o que levaria a uma imunização cruzada contra *S. sonnei*. Com a melhoria da qualidade de vida, devido ao desenvolvimento social, a população passaria a ter acesso a água tratada, o que evitaria a ingestão de *P. shigelloides* e, em consequência, a imunização contra *S. sonnei*. Assim, a shigelose associada a *S. sonnei* passaria a predominar nas regiões mais desenvolvidas de países em desenvolvimento (Sayeed *et al.*, 1992; Sack *et al.*, 1994). Ainda, alguns estudos demonstram que *S. sonnei* surgiu na Europa, há cerca de 500 anos atrás. A partir daí, teria se disseminado entre os continentes há poucas décadas, o que poderia, também, explicar a predominância da bactéria em alguns países (Holt *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos, estudos demonstram que *S. sonnei* é o agente de mais de 70% dos casos de shigelose. Há padrão sazonal, com maior número de casos de junho a outubro (verão-outono) e menor número de dezembro a janeiro (inverno) (Joh *et al.*, 2013). Na Coreia, a frequência da espécie é de 65% e o período de maior incidência é o verão (Kim *et al.*, 2013). No Brasil, há maior prevalência de *S. sonnei* nas regiões mais desenvolvidas, como no Sudeste, enquanto *S. flexneri* é mais frequente

nas regiões menos favorecidas economicamente, como no Nordeste do País (Sousa *et al.*, 2010).

5 Em Belo Horizonte, Minas Gerais, *S. sonnei* é responsável por quase 90% dos casos da doença, observada, principalmente, no verão e no outono. Em Teresina, Piauí, o agente etiológico predominante é *S. flexneri* (cerca de 80%), com maior prevalência nos meses chuvosos. O aumento do número de casos de shigelose nestes períodos sazonais pode ser explicado pela prática recreativa em águas contaminadas com o patógeno ou pelo contato com água contaminada devido ao período chuvoso (Nunes *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013b).

10 Um fator relevante para a disseminação da shigelose é a dose infectante baixa. Para a avaliação da concentração bacteriana e das principais manifestações associadas à doença, foi desenvolvido um estudo com presidiários masculinos saudáveis, da *Maryland House of Correction/EUA*, que foram submetidos voluntariamente à administração por via oral de amostras de *Shigella* diluídas em leite.
15 Os resultados indicaram que são necessárias apenas 10 a 100 células bacterianas para o desenvolvimento da disenteria bacilar (DuPont *et al.*, 1989).

A shigelose manifesta-se pela ocorrência de febre superior a 38 °C, cólicas abdominais e eliminação de fezes mucossanguinolentas. Formas mais graves de apresentação incluem vômitos, anorexia e formação de abscessos e ulcerações na
20 mucosa. Em alguns casos, são relatados mais de 20 episódios evacuatórios por dia (Niyogi, 2005; Marteyn *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013; Mahmoud *et al.*; 2016; Sreenivasan *et al.*, 2016; Duggan & Mostowy; 2018; Kotloff *et al.*, 2018).

Seres humanos e primatas não humanos são os únicos reservatórios conhecidos do microrganismo. A transmissão ocorre, principalmente, pela rota fecal-
25 oral, via ingestão de água e alimentos contaminados. Também pode ocorrer transmissão pessoa-pessoa. A aglomeração, como aquela observada em creches, asilos e penitenciárias, favorece a disseminação da doença. Ainda, a mosca *Musca domestica* é considerada vetor do microrganismo (Jennison & Verma, 2004; Niyogi, 2005; Mokhtari *et al.*, 2012; Nygren *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013; Joh *et al.*, 2013; Kim
30 *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014; Lamboro *et al.*, 2016; González-Torralba *et al.*, 2018; Kotloff *et al.*, 2018).

Crianças com idade inferior a cinco anos são mais suscetíveis à shigelose (Carayol & Nhieu, 2013; Kim *et al.*, 2013; Chen & Kotloff, 2016; Kotloff *et al.*, 2018).

Nunes *et al.* (2012) observaram que, em áreas endêmicas, a prevalência da doença era maior em crianças com faixa etária de 6 a 24 meses. Uma explicação provável para o achado é que, nesta faixa etária, a microbiota indígena está sendo implantada e, portanto, ainda não atua de forma efetiva na proteção contra patógenos. Outra explicação possível é que, nos primeiros seis meses de vida, a criança recebe leite materno, fator protetor, e, ainda, fica mais confinada ao lar. Após esta idade, a criança, com o sistema imunológico ainda imaturo, passa a ter maior contato com o organismo. Conseqüentemente, desenvolve a doença mais comumente, até obter imunidade contra o microrganismo enteropatogênico que circula na região.

Indivíduos imunocomprometidos, como pacientes HIV positivos, tendem a apresentar quadros mais graves, doença diarreica recorrente ou persistente e, inclusive, bacteremia (Niyogi, 2005; Parsot, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Sasakawa, 2010; Nygren *et al.*, 2012; Kotloff *et al.*, 2018). Também, estão mais suscetíveis a complicações, como perfurações intestinais, síndrome hemolítico-urêmica, pneumonia, convulsões, encefalopatias e sepse (Jennison & Verma, 2004; Marteyn *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013).

Pacientes que apresentam formas moderadas de shigelose podem ser tratados com hidratação por via oral e alimentação balanceada. Entretanto, recomenda-se antibioticoterapia, com o intuito de se reduzir a duração e a gravidade do quadro, além de limitar a disseminação da bactéria (Nunes *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; McCrickard *et al.*, 2018).

Resistência a fármacos antimicrobianos, inclusive perfil de resistência múltipla, vem sendo descritos para *Shigella*. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde incluiu *Shigella* na lista dos doze patógenos que requerem, com urgência, a proposição de novas medidas de tratamento (WHO, 2017; Duggan & Mostowy, 2018). A característica está relacionada a hábitos da população relativos ao consumo abusivo do medicamento e à localização geográfica e pode dificultar a abordagem terapêutica em determinadas situações. Taxas de resistência a antimicrobianos mais elevadas são, usualmente, descritas para países em desenvolvimento. Na Ásia, por exemplo, são observadas taxas elevadas de resistência a ciprofloxacina, considerada droga de escolha para tratamento de pacientes com shigelose. No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de sulfametoxazol-trimetoprima como fármaco de escolha. Entretanto, em diferentes regiões do País, a elevação das taxas de resistência ao

antimicrobiano tem sido relatada. Como segunda opção terapêutica, recomenda-se o emprego de quinolonas, contraindicada para gestantes e crianças (Marteyn *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2016; Sreenivasan *et al.*, 2016).

5 Em razão da similaridade entre o LPS de *S. sonnei* e *P. shigelloides*, discutida anteriormente, o organismo tem sido considerado candidato a vacina. Alguns resultados já obtidos reforçam esta possibilidade (Sayeed *et al.*, 1992). Outras pesquisas utilizam linhagens vivas atenuadas de *Shigella* e moléculas glicoconjugadas. Ainda, o *The Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) e dados da literatura sugerem o
10 desenvolvimento de vacina quadrivalente contra o gênero, contendo a linhagem atenuada ou antígenos de *S. sonnei* e *S. flexneri* 2a, 3a e 6, que atuaria contra cerca de 65% das linhagens circulantes. Há, também, a sugestão de inclusão de *S. dysenteriae* tipo 1, com o intuito de prevenir uma possível pandemia no futuro (Barry *et al.*, 2013).

15

1.2 PEPTÍDIOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS

20

1.2.1 HISTÓRICO

Há muitos anos, os mecanismos de defesa contra patógenos despertam o
25 interesse da comunidade científica. Diversas questões nesse âmbito ficaram por algum tempo sem respostas, como a estratégia utilizada por plantas e insetos para se protegerem de infecções contra patógenos, visto que esses organismos não dispõem de sistema inume adaptativo. Essas e outras questões passaram a serem respondidas pela descoberta de compostos com ação antagonista, como os peptídios e proteínas
30 antimicrobianos, pois, assim como os procariotos, os eucariotos também utilizam essa forma de defesa (Phoenix *et al.*, 2013a).

Historicamente, um dos primeiros relatos da ação antagonista foi observada por Gratia, em 1925, quando ele identificou uma substância termolábil em cultura de

Escherichia coli V, capaz de atuar contra *E. coli* S, a qual denominou colicina V, hoje, conhecida como microcina V (Gillor *et al.*, 2009). Em 1928, Fleming isolou uma substância antagonista produzida por *Penicillium chrysogenum*, o qual foi denominado penicilina e, em 1945, juntamente com Howard Florey e Ernst Chain, o pesquisador recebeu o Prêmio Nobel de Medicina por sua descoberta. Outro relato da produção de de peptídeo antimicrobiano (AMP) foi em 1939, quando Dubos observou a atividade inibitória de *Bacillus brevis* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Mais tarde, a substância ativa identificada por Dubos passou a ser comercializada como o antibiótico garamicina (Bahar & Ren, 2013; Phoenix *et al.*, 2013a).

10 Em 1942, uma substância ativa, observada em 1896, foi isolada do endosperma de *Triticum aestivum*. O composto apresentava ação contra fitopatógenos, dentre eles, *Pseudomonas solanacearum* e *Xanthomonas campestris*. Atualmente, a substância é amplamente encontrada no reino *Plantae* e pertence à família das tianinas (Balls, 1942; Phoenix *et al.*, 2013a).

15 Os relatos da síntese desses compostos também são comuns entre os animais. São exemplos, o peptídeo defensina, isolado pela primeira vez em 1956 de leucócitos de coelhos, a proteína lactoferrina, purificada do leite na década de 60, o peptídeo catiônico α -hélice cecropina, isolado da hemolinfa de pupas em 1981, e o peptídeo aniônico purificado pela primeira vez de *Xenopus laevis* na década de 90 (Bahar & Ren, 2013; Phoenix *et al.*, 2013a).

20 Atualmente, a síntese de várias proteínas e peptídios com ação antimicrobiana pelas mais diversas classes de seres vivos como bactérias, vírus, fungos, insetos, protozoários, plantas e animais já foi descrita (Bahar & Ren, 2013; Suda *et al.*, 2017). Eles constituem uma linha de defesa contra patógenos ou contra outro microrganismo competidor, sendo, assim, considerada como um mecanismo de sobrevivência empregado por vários organismos (Ageitos *et al.*, 2016).

1.2.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS

Sintetizado pelos mais variados seres vivos, os peptídios antimicrobianos são um grupo diversificado de moléculas, que são divididos em subgrupos, com base em sua estrutura e composição de aminoácidos (Brogden, 2005; Sang & Blecha, 2008). As características estruturais, como tamanho e carga catiônica ou aniônica, são importantes para a ação antimicrobiana da molécula (Bahar & Ren, 2013; Phoenix *et al.*, 2013b; Ageitos *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016).

A atração entre o AMP e a bactéria alvo culmina com a formação de ligações eletrostáticas entre as porções catiônica ou aniônica do peptídio e a superfície bacteriana. Assim, os AMP catiônicos são atraídos pelas estruturas aniônicas da parede bacteriana, como fosfolipídios aniônicos e grupo fosfato dos lipopolissacarídeos, no caso de bactérias Gram negativas, e ácido teicóico, para as bactérias Gram positivas. Em seguida, eles atravessam a parede celular e interagem com a membrana citoplasmática. Após esse contato, os peptídios atuam no alvo bacteriano, que pode ser a membrana citoplasmática e/ou componentes intracelulares (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*; 2006, Bahar & Ren, 2013; Seo *et al.*, 2017; Jeżowska-Bojczuk & Stokowa-Sołtys, 2018).

Para explicar essa interação entre os AMPs e a membrana citoplasmática, foram propostos alguns modelos, e, dentre esses: *Barrel stave*, *Carpet model*, *Toroidal pore*, *Electroporation*, *Non-lytic membrane depolarization*, *Disordered toroidal pore*, *Membrane thinning/thickening* e *Non-bilayer intermediate* (Nguyen *et al.*, 2011). Os três primeiros são considerados clássicos e promovem a ruptura da membrana (Brogden, 2005).

No modelo poros em barril (*Barrel stave*), há o depósito, de maneira paralela, do peptídio sobre a membrana citoplasmática, que em seguida é deslocado de forma perpendicular à membrana, levando à sua inserção. Assim, a porção hidrofóbica do peptídio fica em contato com a membrana bacteriana e a porção hidrofílica fica posicionada para o interior do poro transmembrânico (Brogden, 2005; Bahar & Ren, 2013; Lee *et al.*, 2016).

No modelo tapete (*Carpet model*), ocorre uma interação eletrostática do peptídio catiônico com a porção aniônica da cabeça polar dos fosfolipídios de

membrana. O acúmulo dos peptídios sobre a membrana leva à formação de um tapete que atua como um detergente, levando à desestabilização e desintegração da membrana, havendo a formação de pequenos agregados peptídeos e micelas. Semelhante ao modelo em barril, nesse modelo, a porção hidrofóbica do peptídio também está em contato com o *core* hidrofóbico da membrana citoplasmática (Brogden, 2005; Bahar & Ren, 2013; Lee *et al.*, 2016).

No modelo toroidal (*Toroidal pore*), o peptídio se liga à porção polar dos fosfolipídios da membrana citoplasmática e induz o dobramento destes pela inserção perpendicular do peptídio na membrana, levando à formação de poros (Brogden, 2005; Bahar & Ren, 2013; Lee *et al.*; 2016).

Embora a permeabilização da membrana seja uma estratégia eficiente para a morte da célula e a mais frequentemente relatada, outros mecanismos, que envolvam componentes intracelulares como alvo, são descritos. Eles envolvem a inibição da síntese proteica, da transcrição da replicação do DNA e da biosíntese da parede celular e a inativação de enzimas fundamentais para a sobrevivência celular (Scocchi *et al.*, 2016).

Assim, o peptídio NCR247, isolado de *Medicago truncatula*, inibe a síntese proteica de *Synorhizobium melilot*, por se ligar aos ribossomos. Da mesma forma, os AMPs ricos em prolina isolados de insetos e mamíferos apresentam ação antibacteriana, impedindo a síntese proteica (Scocchi *et al.*, 2016). O peptídio PR-39, isolado do intestino de porcos, leva à morte bacteriana pela inibição da síntese de proteínas e de DNA (Bahar & Ren, 2013; Scocchi *et al.*, 2016). A histona H2A, isolada da rã *Bufo bufo gargarizans*, tem ação antagonista contra *E. coli* por se ligar ao DNA, assim como o peptídio Puro B, rico em triptofano. A plesctasina, de origem fúngica, apresenta atividade *in vivo* e *in vitro* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, atuando na parede celular (Scocchi *et al.*; 2016). A bacitracina tem atividade antibacteriana dependente dos íons divalentes Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} . Ela foi isolada de *B. subtilis* e *B. licheniformis* e atua na inibição da formação da camada de peptidoglicano (Ageitos *et al.*, 2016). O AMP cíclico tirocidina, isolado de *B. brevis*, atua na membrana citoplasmática e inativa a enzima glicose dehidrogenase de bactérias Gram positivas e Gram negativas (Ageitos *et al.*, 2016). A histatina 5, isolada de tecido periodontal, inibe as proteases de *Bacteroides gingivalis* (Bahar & Ren; 2013). O AMP cíclico colistina leva à desestabilização da membrana por atuar nos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} .

Ele foi isolado de *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* e, atualmente, é utilizado no tratamento de bactérias multirresistente das espécies de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (Ageitos *et al.*, 2016).

5

1.2.3 MOLÉCULAS MULTIFUNCIONAIS

Já foram relatados mais de 5000 peptídios antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação (Lee *et al.*, 2016). No entanto, essas moléculas versáteis apresentam outras funções que não apenas a ação antagonista contra células eucariotas e procariontes e vírus. Lactoferrina foi inicialmente identificada como um ligante do íon ferro e, mais tarde, ela foi classificada como um AMP, pela sua capacidade de eliminar as células bacterianas por meio da interação com a membrana citoplasmática sem a utilização da via de ligante de ferro (Phoenix *et al.*, 2013a). Ela também apresenta ação antiviral, antifúngica e antiparasitária (Jenssen & Hancock, 2009).

As proteínas ribossomais são componentes essenciais dos ribossomos, que desempenham ação fundamental na síntese proteica (Lu *et al.*; 2015). Além desta função clássica, algumas outras funções foram atribuídas a partes dessa organela. Por exemplo, a porção N-terminal Hp(2-20) da proteína ribossomal L1(RpL1) isolada de *Helicobacter pylori* apresenta ação antagonista contra bactérias, fungos e protozoários (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2016). A proteína ribossomal S21, pertencente à subunidade 30S, isolada de *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a também possui ação antagonista contra *Enterococcus faecalis* ATCC 19483, *L. sakei* ATCC 15521, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria innocua* Li7 e *Staphylococcus epidermidis* (Carvalho *et al.*, 2010). A proteína ribossomal L29, isolada do extrato pulmonar e do intestino delgado de camundongos, apresenta ação contra *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* e diferentes linhagens de *P. aeruginosa* (Meyer-Hoffert *et al.*, 2008). E a proteína ribossomal L29 purificada das brânquias das ostras do Pacífico são ativas contra *E. coli*, *B. subtilis* e *Vibrio parahemolyticus* (Seo *et al.*, 2017).

As histonas são proteínas essenciais para o empacotamento do DNA nos cromossomos (Rattray & Muller, 2012). A região N-terminal da histona H2A, isolada do

tecido estomacal do sapo africano *Bufo bufo gargarizans*, denominada buforina, apresenta ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos (Park *et al.*, 1996). A proteína tipo histona H2B, isolada de peixe *Ictalurus punctatus*, demonstrou antagonismo contra os patógenos de peixe *Aeromonas hydrophila* e *Saprolegnia* spp. (Robinette *et al.*, 1998). A proteína tipo histona isolada do sobrenadante da cultura de *L. sakei* subsp. *sakei* 2a atua contra *L. monocytogenes* e *E. faecalis*, provavelmente por interagir com a estrutura e replicação do DNA (Carvalho *et al.*, 2010).

Constituintes dos eritrócitos e responsável por carrear moléculas de oxigênio para os pulmões em vertebrados, a hemoglobina já foi descrita como uma substância multifuncional (Giardina *et al.*, 1995). Outros achados demonstram que fragmentos de hemoglobina, denominados peptídeo Hb β P1, P2 e P3, isolados de bagre americano, *I. punctatus*, possuem ação antibacteriana e antiparasitária (Ullal *et al.*, 2008).

15

1.3 BACTERIOCINAS

20 1.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo bacteriocina foi proposto por Jacob *et al.* (1952) e passou a ser utilizado com mais frequência a partir dos estudos de Tagg *et al.* (1976) e Klaenhammer (1988). O termo define substâncias proteicas sintetizadas por bactérias, com atividade biológica principalmente contra amostras filogeneticamente relacionadas (Daw & Falkiner, 1996; Rea *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011a).

Algumas diferenças entre os antibióticos clássicos e as bacteriocinas podem ser relatadas. As bacteriocinas são sintetizadas pela maquinaria ribossomal, apresentam espectro de ação mais limitado, atuando, mais frequentemente, contra espécies geneticamente próximas à linhagem produtora e são ativas em concentrações muito baixas, na faixa de nanomolar. Já os antibióticos clássicos são sintetizados por enzimas, atuam, habitualmente, contra uma gama mais ampla de bactérias,

demonstrando espectro de ação abrangente, e são ativas em concentrações superiores, em geral, concentrações micromolares (Nes, 2011; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012; Fahim *et al.*, 2016).

5 A síntese de bacteriocinas é uma habilidade bastante disseminada entre Eubacteria e Archaeobacteria. É comum a expressão de mais de uma bacteriocina, já tendo sido relatada a síntese de dezenas ou até mesmo centenas de tipos diferentes destes agentes antagonistas por uma mesma espécie (Riley, 2011).

10 Sabe-se que estas proteínas bioativas constituem um grupo bastante diversificado no que se refere a massa molecular, alvo microbiano, modo de ação, liberação e mecanismos de imunidade. Elas são capazes de reconhecer e interagir com receptores específicos presentes na superfície da célula alvo, possibilitando a penetração no meio intracelular. Então, as bacteriocinas interferem na estrutura e biossíntese da parede celular, provocam a degradação inespecífica do DNA, inibem a síntese proteica ou levam à formação de poros e à permeabilização da membrana celular (Gillor *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010; Majeed *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011b; Reid *et al.*, 2011; Riley, 2011; Bakkal *et al.*, 2012).

15 As bacteriocinas exercem papel relevante nas relações inter e intraespecíficas, influenciando a diversidade microbiana, e podem representar fator de virulência importante para a bactéria produtora (Gillor *et al.*, 2009; Šmajš *et al.*, 2010; Majeed *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011b; Bakkal *et al.*, 2012; Šmajš *et al.*, 2012). Em estudo que investigou 411 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção intestinal, observou-se que 55% delas produziam bacteriocinas, sugerindo que a característica facilitaria a colonização deste ambiente. Em contrapartida, a substância pode atuar como arma de defesa de bactérias endógenas, protegendo o hospedeiro contra o estabelecimento de amostras exógenas potencialmente patogênicas (Šmajš *et al.*, 2010; Šmajš *et al.*, 2012).

25 Por razões históricas ou econômicas, colicinas produzidas por enterobactérias e bacteriocinas sintetizadas por bactérias do ácido lático são as mais bem estudadas (Rebuffat, 2011a). Para contribuir para o melhor conhecimento destas substâncias, um banco de dados *online* (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>), denominado BACTIBASE, foi criado. Entre outras, estão disponíveis informações relativas a características físico-químicas, estruturais e microbiológicas das mesmas (Nishie *et al.*, 2012; Hammami *et al.*, 2013; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2018).

1.3.2 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS

Bactérias Gram positivas sintetizam bacteriocinas semelhantes aos peptídios antimicrobianos produzidos pelos eucariotos. As substâncias apresentam caráter catiônico e anfifílico. São muito abundantes e diversificadas, codificadas, mais comumente, por genes plasmidiais, podendo também ser codificadas por genes localizados em cromossomos e transpósons (Riley & Wertz, 2002; Gillor *et al.*, 2009; Bakkal *et al.*, 2012). Apresentam um amplo espectro de ação. Por exemplo, bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* são ativas contra bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus*, e bactérias Gram negativas, como *Campylobacter* e *Salmonella* (Belguesmia *et al.*, 2010).

Diferentemente das colicinas, a síntese de bacteriocinas não é um evento letal para as bactérias Gram positivas. Isto se deve aos mecanismos de transporte utilizados para liberação das substâncias. Algumas células apresentam um sistema de transporte específico para bacteriocinas, enquanto outras possuem via de exportação secundária (Riley & Wertz, 2002).

As bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram positivas podem ser divididas em quatro grupos. A classe I inclui os lantibióticos, grupo bastante estudado. Algumas características relevantes deste grupo podem ser citadas. Os lantibióticos apresentam massa molecular inferior a 5 kDa, possuem aproximadamente 19 a 38 aminoácidos, são sintetizados no nível ribossomal, sofrem modificações pós-traducionais e apresentam os aminoácidos lantionina e β -metil lantionina, os quais formam múltiplas estruturas em anéis, contribuindo para a resistência ao calor, à ação proteolítica, a uma ampla faixa de pH e à oxidação (Nishie *et al.*, 2012; Kaur & Kaur, 2015; Woraprayote *et al.*, 2016; Kaškonienė *et al.*, 2017; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2018).

Os lantibióticos apresentam amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e podem ser divididos em subgrupos. Os lantibióticos tipo A, como a nisina, são moléculas carregadas positivamente, que atuam formando poros nas células sensíveis e impedindo a síntese correta do peptidoglicano. Os lantibióticos do tipo B, como a mersacidina, atuam na síntese da parede celular. Uma terceira subclasse é composta por dois peptídios lantibióticos, um que se assemelha ao lantibiótico do tipo B e outro ao do tipo A, atuando tanto na formação de poros na célula alvo, como na

desorganização da síntese do peptidoglicano (Garneau *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2009; Lohans & Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012; Balciunas *et al.*, 2013).

Na classe II, estão incluídas bacteriocinas estáveis ao calor, com massa molecular inferior a 10 kDa, formadas por aminoácidos não modificados, sintetizadas, principalmente, por bactérias do ácido láctico. Atuam na permeabilização da membrana citoplasmática, o que acarreta extravasamento do conteúdo celular. Esta classe divide-se em três subclasses, IIa, IIb e IIc. As bacteriocinas da subclasse IIa contêm uma sequência de aminoácidos conservada na região N-terminal (YGNGVXaaC) e agem formando poros na membrana. Apresentam grande atividade contra *L. monocytogenes*. Os principais representantes são a pediocina, a sakacina A e a leucocina A. A subclasse IIb inclui bacteriocinas formadas por dois peptídios ativos que, separadamente, são inativos. Representantes desta subclasse são a plantaricina e a lactacina F. Bacteriocinas que apresentam uma ligação covalente entre a porção N-terminal e C-terminal, resultando em uma estrutura cíclica, são agrupadas na subclasse IIc. São produzidas por células com secreção sec-dependente, como a lactococcina e enterocina AS-48 (Garneau *et al.*, 2002; Rea *et al.*, 2011; Lohans & Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012; Balciunas *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Kaur & Kaur, 2015; Woraprayote *et al.*, 2016; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2018).

Na classe III, enquadram-se bacteriocinas com massa molecular superior a 30 kDa, sensíveis ao calor, que promovem a lise da parede celular da bactéria alvo. A porção N-terminal é homologa a um endopeptídio envolvido na síntese da parede celular e a porção C-terminal reconhece a célula alvo. Como exemplos, citam-se a helveticina J e a millericina B.

A classe IV agrupa bacteriocinas complexas, compostas por uma associação de proteínas com lipídios ou carboidratos (Garneau *et al.*, 2002; Rea *et al.*, 2011; Lohans & Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012; Balciunas *et al.*, 2013; Kaškonienė *et al.*, 2017). Entretanto, alguns pesquisadores sugerem que estas moléculas presentes nas bacteriocinas da classe IV seriam apenas artefatos de purificação e a classe IV não representaria uma classe diferente de bacteriocina (Cleveland *et al.*, 2001; Balciunas *et al.*, 2013).

As bacteriocinas características de bactérias Gram positivas são sintetizadas como um pré-peptídio inativo, que é transportado pela superfície da célula produtora durante a fase de crescimento exponencial, sendo clivado enzimaticamente para

tornar-se ativo (Balciunas *et al.*, 2013). Assim, as bacteriocinas de classe I são codificadas por um conjunto de genes, quais sejam, o gene estrutural, que codifica uma pré-bacteriocina, um gene que codifica uma proteína acessória responsável pelo processamento proteolítico do peptídeo líder, um gene que codifica as proteínas do sistema de transporte ABC, um gene associado à regulação e um gene responsável pela imunidade, que protege a célula produtora contra a sua própria bacteriocina. A pré-bacteriocina inativa contém uma extremidade N-terminal ou peptídeo líder acoplado ao pró-peptídeo que é modificado, iniciando a maturação do peptídeo ativo. O peptídeo líder é clivado pela protease antes ou após a translocação pelo sistema ABC. Por fim, a bacteriocina ativa é liberada (Dicks *et al.*, 2011).

No que se refere a bacteriocinas de classe II, o conjunto de genes relacionados à expressão de bacteriocinas é semelhante ao descrito para a classe I. Observa-se um gene estrutural, um gene associado à imunidade, um gene que codifica as proteínas acessórias e um gene para a produção das proteínas do sistema de transporte ABC. O pré-peptídeo, codificado pelo gene estrutural, contém um peptídeo líder que é clivado pela protease, tornando-o ativo (Dicks *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que algumas bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas agem como moléculas autoindutoras, capazes de regular sua própria expressão, atuando como mediadores de *quorum sensing*. Este comportamento influencia na simbiose, virulência, formação de biofilme e competição (Majeed *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011b).

1.3.3 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS

As bactérias Gram negativas são capazes de produzir bacteriocinas com atividade bactericida ou bacteriostática. Merecem destaque as bacteriocinas sintetizadas por membros da família *Enterobacteriaceae*, as mais bem estudadas do grupo, em especial, bacteriocinas produzidas por *E. coli*, as primeiras a serem investigadas. As bacteriocinas expressas por *Enterobacteriaceae* são denominadas colicinas e microcinas. Alguns autores empregam o termo bacteriocinas tipo colicina para as substâncias proteicas com espectro de ação restrito, como piocinas, que são

sintetizadas por *Pseudomonas* (Rebuffat, 2011a; Bakkal *et al.*, 2012; García-Bayona *et al.*, 2017; Singh, 2018).

5 1.3.3.1 COLICINAS E BACTERIOCINAS TIPO COLICINA

Colicinas são bacteriocinas produzidas por enterobactérias que possuem massa molecular de 25 a 80 kDa, podendo ser codificadas por genes plasmidiais ou cromossômicos (Riley 2009; Yang *et al.*, 2014). O gene que codifica a síntese de colicinas está localizado em um óperon que contém mais dois genes, associados à expressão da proteína de imunidade, que protege a célula produtora da sua própria colicina, e à promoção da lise celular, para liberação da colicina no ambiente (Riley 2009; Rebuffat, 2011a).

A produção de colicinas é mediada pelo sistema SOS, ativado, principalmente, em momentos de estresse celular (Riley & Wertz, 2002; Rebuffat, 2011a; Riley, 2011; Grinter *et al.*, 2012). O sistema SOS é composto pelas proteínas RecA e LexA. LexA é um repressor transcricional, que impede a síntese da bacteriocina. Em condições de estresse, como na escassez de nutrientes ou em densidades populacionais elevadas, *recA* é ativado, levando à expressão de RecA. Este, por sua vez, liga-se a LexA, promovendo, assim, a produção da colicina (Bakkal *et al.*, 2012; Mavridou *et al.*, 2018).

As colicinas são classificadas de acordo com seu alvo/mecanismo de ação. O primeiro grupo age no DNA e no RNA, atuando como nuclease; o segundo desestabiliza a membrana citoplasmática, por meio da formação de poros; e o terceiro age sobre o peptidoglicano (Corsini *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010; Rebuffat, 2011a; Yang *et al.*, 2014). Como exemplos, as colicinas E2, E7, E8 e E9 e as piocinas S1, S2 e S3 possuem atividade de DNase; as colicinas E5 e D, a klebicina D e a piocina S4 atuam como tRNases; as colicinas E3, E4 e E6, a cloacina DF13 e a klebicina C agem como rRNases; as colicinas A, B, Ia, Ib, K, N, U, S4, E1, 5 e 10, as alveicinas A e B, a marcescina 28b e a piocina S5 atuam na formação de poros; e a colicina M inibe a biossíntese de mureína (Rebuffat, 2011a; Braun & Patzer, 2013; Yang *et al.*, 2014; Kaur & Kaur, 2015).

Para atuar no alvo bacteriano, as colicinas precisam reconhecer e se ligar de forma específica aos receptores celulares, os quais são responsáveis pela captação de

nutrientes essenciais, como o receptor BtuB para vitamina B12, os receptores para sideróforo FhuA, FepA, Cir e Fiu, o receptor para nucleosídeo Tsx e os canais de porinas. O processo de translocação pode variar entre as bacteriocinas. Os receptores utilizados para o reconhecimento celular estão acoplados aos sistemas Tol e Ton, presentes na membrana interna, que fornecem energia para o processo (Rebuffat, 2011a; Zamaroczy & Chauleau 2011; Braun & Patzer, 2013; Yang *et al.*, 2014; Schneider, *et al.*; 2018). Colicinas do grupo A utilizam o sistema de membrana Tol (proteínas TolA, TolQ, TolR e TolB) e colicinas do grupo B fazem uso do sistema de transporte Ton (proteínas TonB, ExbB e ExbD) (Braun & Patzer, 2013; Yang *et al.*, 2014).

Colicinas e bacteriocinas tipo colicinas são proteínas não modificadas, sensíveis a proteases, que apresentam três domínios funcionais, quais sejam: um domínio central, responsável pelo reconhecimento dos receptores específicos na superfície da célula alvo; uma porção N-terminal, responsável pela translocação da proteína através da membrana citoplasmática e da parede celular, direcionado-a a seu alvo de ação; e uma porção C-terminal, que atua no alvo celular, sendo responsável pela região de imunidade (Cascales *et al.*, 2007; Gillor *et al.*, 2009; Rebuffat, 2011b; Kaur & Kaur, 2015; Ghequire *et al.*; 2018; Schneider, *et al.*; 2018). Esta estrutura não é observada nas bacteriocinas das bactérias do ácido lático e nas microcinas (Rebuffat, 2011b; Zamaroczy & Chauleau, 2011).

1.3.3.2 MICROCINAS

Microcinas, termo cunhado por Asensio *et al.* (1976), são substâncias antagonistas de baixa massa molecular (< 10 kDa), resistentes a proteases, sintetizadas, principalmente, por *E. coli* (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012; Severinov & Nair; 2012; Kaur & Kaur, 2015; Kaur *et al.*, 2016). Embora tenham sido descritas há mais de cinco décadas, as substâncias ainda são pouco estudadas. Até o momento, apenas 16 microcinas foram relatadas, das quais nove foram caracterizadas do ponto de vista estrutural MccB17, MccC7/C51, MccE492, MccJ25, MccL, MccM, MccV, MccPDI e Mcc24 (também conhecida como microcina N) (Rebuffat, 2012; Zhao *et al.*, 2017). Duas, MccH47 e MccI47, por estudos genéticos e

cinco, MccS, MccD93, Mcc140, Mcc15m e Mcc15n, por poucos estudos bioquímicos (Duquesne *et al.*, 2007; Zschuttig *et al.*, 2012).

As microcinas são produzidas, preferencialmente, na fase estacionária do crescimento bacteriano, com exceção das microcinas E492 e 24, que são sintetizadas na fase exponencial (Lagos *et al.*, 2009; Noriega, 2009). São solúveis em solventes orgânicos, possuem caráter hidrofóbico, são resistentes a uma ampla faixa de pH e a algumas proteases e não são induzidas pelo sistema SOS (Duquesne *et al.*, 2007; Corsini *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2016). São estáveis em temperaturas variadas, como a microcina J25, que continua ativa após autoclavação (Duquesne *et al.*, 2007; Severinov *et al.*, 2011).

Outras características incluem produção estimulada por condições de estresse, como carência de nutrientes e oxigênio, atuação como potentes agentes antibacterianos, mesmo em doses muito baixas (nanomolar) e ausência de atividade contra a linhagem produtora. Esta resistência da linhagem produtora parece ser observada durante a fase exponencial de crescimento bacteriano, sendo expressa independentemente da produção da microcina (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2011b; Severinov *et al.*, 2011). Ao contrário das células que sintetizam colicinas, as células produtoras de microcinas são capazes de produzir a toxina continuamente, sem a perda da viabilidade celular, o que se deve ao sistema de transporte da substância através das membranas da célula produtora (Severinov *et al.*, 2011).

Assim como algumas linhagens bacterianas são capazes de sintetizar mais de uma colicina, o mesmo fenômeno é observado para amostras produtoras de microcinas. Como exemplo, podem ser citadas as linhagens *E. coli* H47, que sintetiza as microcinas H47 e I47, e as amostras *E. coli* Nissle (Mutaflor), *E. coli* CA46 e *E. coli* CA58, que expressam as microcinas M e H47 (Duquesne *et al.*, 2007; Vassiliadis *et al.*, 2011).

Estas substâncias bioativas são codificadas por um conjunto de genes, geralmente, quatro, carregados por plasmídios ou cromossomos. São eles, um gene estrutural que codifica os precursores das microcinas, um gene adjacente que codifica os fatores de imunidade que protegem a célula produtora da sua própria microcina e dois genes responsáveis por codificar o sistema de transporte necessário para a exportação da microcina para o meio extracelular (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat,

2011b; Vassiliadis *et al.*; 2011). Outros genes adicionais também podem ser encontrados, atuando na codificação de enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais, como observado para as microcinas de classe IIb (Duquesne *et al.*, 2007; Vassiliadis *et al.*; 2011).

5 A classificação das microcinas leva em consideração três critérios: presença, natureza e localização das modificações pós-traducionais, organização do conjunto de genes e sequência do peptídeo líder (Rebuffat, 2011a). A classe I (microcinas B17, C7-C51 e J25) abriga substâncias com massa molecular inferior a 5 kDa, que passam por drásticas modificações pós-traducionais, levando a estruturas tais como tiazol e anéis azólicos. A classe II é representada por peptídios com massa molecular de 5 a 10 kDa, agrupados em duas subclasses. Na subclasse IIa, são incluídas microcinas codificadas por plasmídios, que não sofrem modificações pós-traducionais, exceto pela adição de ligação dissulfeto, observada nas microcinas L e V. Nesta subclasse, também está incluída a microcina 24, que não apresenta tal ligação. A subclasse IIb é constituída pelas microcinas lineares codificadas por cromossomos, que não possuem ligações dissulfeto, apresentam uma região C-terminal conservada rica em serina e carregam partes tipo sideróforo. São incluídas nesta subclasse as microcinas E492, M, H47 e I47 (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Severinov *et al.*, 2011; Vassiliadis *et al.*, 2011; Rebuffat, 2012; Etayash *et al.*; 2016; Kaur *et al.*, 2016; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2018).

20 Assim como as bacteriocinas expressas por bactérias Gram positivas, as microcinas são sintetizadas como um peptídeo precursor, denominado pró-microcina, que é formado por uma região C-terminal e um peptídeo líder, localizado na região N-terminal, com cerca de 15 a 37 resíduos de aminoácidos. Representa exceção a esta regra a microcina C7/C51, que é secretada sem a clivagem do peptídeo precursor (Duquesne *et al.*, 2007). A porção C-terminal é necessária para o reconhecimento do receptor da célula sensível e a região N-terminal da microcina madura (sem o peptídeo líder) é responsável pela atividade bacteriana (Lagos *et al.*, 2009; Vassiliadis *et al.*, 2011).

1.3.4 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR ARCHAEA

Archaea é o termo que designa um dos três domínios dos seres vivos, que inclui organismos procariotos que habitam, em geral, ambientes extremos. Membros deste grupo são capazes de produzir substâncias proteicas tipo bacteriocinas, denominadas arqueocinas. Estas inibem outros microrganismos filogeneticamente relacionados, mas, também, há relatos de atividade contra membros do domínio Bacteria (Ellen *et al.*, 2011).

Francisco Rodriguez-Valera, em 1982, foi o primeiro a descrever uma substância tipo bacteriocina produzida por Archaea. A amostra era halofílica e, então, a substância foi denominada halocina S8 (Price & Shand, 2000; Riley & Wertz, 2002; Mei *et al.*, 2008; Ellen *et al.*, 2011). As halocinas são sintetizadas no nível de ribossomos, principalmente, no final da fase exponencial e na fase estacionária de crescimento. A habilidade confere vantagem seletiva à amostra produtora, importante em situações de estresse, como na escassez de nutrientes (Riley & Wertz, 2002).

Algumas halocinas são originadas de grandes proteínas precursoras, que são processadas formando polipeptídios biologicamente ativos (Mei *et al.*, 2008; Ellen *et al.*, 2011). Sua massa molecular varia de 4 a 35 kDa. Como as microcinas, as halocinas com massas moleculares menores são denominadas micro-halocinas, como é o caso da S8 (Price & Shand, 2000; Ellen *et al.*, 2011). As halocinas são codificadas por um plasmídio grande e apresentam alta resistência, podendo ser dessalinizadas, submetidas à fervura e a tratamento com solventes orgânicos e armazenadas a 4 °C por períodos prolongados (Riley & Wertz, 2002; Riley, 2009). O espectro de ação varia entre diferentes halocinas. Por exemplo, a halocina H4 possui um espectro de ação estreito, enquanto a halocina A4 pode atuar contra amostras termoacidófilas, como *Crenarchaea* (Ellen *et al.*, 2011).

Membros do gênero *Sulfolobus* multiplicam-se em temperaturas de 65 a 85 °C e pH de 2 a 4. Algumas linhagens de *Sulfolobus islandicus* produzem uma arqueocina denominada sulfolobicina, com massa molecular de 20 kDa, ativa contra amostras relacionadas (Ellen *et al.*, 2011). Esta atividade está associada à membrana, o que indica que a substância antagonista não é liberada da célula produtora (Bakkal *et al.*, 2012).

1.4 APLICABILIDADE DAS BACTERIOCINAS

5 Existe um campo amplo para aplicação de bacteriocinas. Destacam-se seu emprego na indústria alimentícia e na área de saúde humana e animal.

1.4.1 BACTERIOCINAS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

10 Bacteriocinas são consideradas aliadas no contexto das indústrias alimentícias, empregadas na conservação de alimentos, devido à sua capacidade de aumentar a vida de prateleira dos produtos. Assim, é possível a redução da utilização de aditivos químicos e métodos físicos de controle microbiano, habitualmente, empregados na
15 conservação de carnes, laticínios, produtos a base de ovos, saladas, legumes fermentados e produtos de panificação de alta umidade (Abdel-Mohsein *et al.*, 2010; Lohans & Vederas, 2012; Fahim *et al.*, 2016).

Diversos fatores devem ser considerados na avaliação de uma bacteriocina como candidata a conservante alimentar. Merecem menção ausência de alteração da
20 carga eletrostática, solubilidade da bacteriocina quando em contato com os alimentos e incapacidade de ligação aos componentes alimentares (Schulz *et al.*, 2003).

Bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico vêm sendo empregadas na indústria alimentícia, uma vez que elas não interferem nas características sensoriais do alimento, como odor e sabor, são estáveis ao calor e são atóxicas para o
25 consumidor. Nisina e pediocina PA1 são amplamente utilizadas, sendo encontradas comercialmente como nisaplin e ALTA 2341, respectivamente (Nishie *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; Kaškonienė *et al.*, 2017).

Nisina é uma bacteriocina produzida por amostras de *Lactococcus lactis*, ativa contra bactérias Gram positivas. Em 1969, a Organização de Alimentos e
30 Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) liberou seu uso como um aditivo alimentar. Seu consumo pode chegar a 33.000 unidades internacionais/kg de peso corpóreo. Ela pode ser empregada na conservação de leite, queijo, produtos

lácteos, tomates, vegetais e sopas enlatados, maionese e alimentos infantis (Schulz *et al.*, 2003).

A nisina também é utilizada na conservação de salmão para consumo humano. Esta bacteriocina dificulta a multiplicação de *L. monocytogenes* no peixe e, na
5 presença de uma atmosfera rica em CO₂, no produto embalado, observa-se a inibição da bactéria. A bacteriocina V41, produzida por *Carnobacterium divergens*, também foi utilizada para este fim (Bakkal *et al.*, 2012).

A FDA (*Food & Drug Administration*) dos EUA concedeu, por duas vezes, o *status* de GRAS (*Generally Recognized As Safe* - GRN 593 e GRN 676) para as
10 colicinas sintetizadas por plantas transgênicas, com ação antagonista contra amostras patogênicas de *E. coli*, por serem excelentes candidatas à aditivos alimentares na conservação de frutas, verduras e produtos cárneos (Schneider, *et al.*; 2018). A síntese de colicinas, por plantas transgênicas, demonstra um caminho promissor na produção das biomoléculas, uma vez que elas são ativas e idênticas as
15 colicinas produzidas por bactérias; são mais facilmente purificadas, evitando a contaminação por endotoxinas; e são expressão em níveis elevados, favorecendo o custo benefício (Ghequire & Mot, 2018).

O Brasil é pioneiro na utilização de bacteriocinas na conservação de produtos cárneos, como salsichas (Schulz *et al.*, 2003). Como exemplo, cita-se a microcina
20 MccV, que, ao contrário da nisina, também atua contra bactérias Gram negativas (Riley & Wertz, 2002; Duquesne *et al.*, 2007).

A bacteriocina lacticina 3147 também demonstrou utilidade para emprego na conservação de alimentos. Os dados indicaram inativação rápida de *L. monocytogenes* e redução do número de células viáveis de *S. aureus* em formulação infantil a base de
25 leite. A substância também foi altamente eficiente contra *L. monocytogenes* em iogurte natural e queijo cottage (Galvéz *et al.*, 2011).

Espécies produtoras de bacteriocinas isoladas de vinho, tais como *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni* e *Pediococcus pentosaceus* podem ser úteis
30 contra bactérias do ácido láctico produtoras de histamina durante a vinificação, auxiliando no controle da fermentação maloláctica (Galvéz *et al.*, 2011). Também já foi relatada a associação de bacteriocinas, como nisina e pediocina, com outros métodos, como uso de campo elétrico pulsado, ácidos orgânicos e alta pressão hidrostática, para

potencializar a eficácia do tratamento, principalmente contra bactérias Gram negativas (Nishie *et al.*, 2012).

5 1.4.2 BACTERIOCINAS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

Muito se tem discutido sobre a crescente resistência bacteriana a drogas antimicrobianas e a disseminação da característica, cujo controle torna-se cada vez mais difícil. A propriedade é, muitas vezes, associada à utilização indiscriminada de antimicrobianos convencionais de amplo espectro, em decorrência da pressão seletiva gerada. Assim, é fundamental o uso racional destas substâncias e é altamente desejável a pesquisa de outras drogas, com espectro de ação mais limitado, que podem proporcionar a atuação apenas sobre o alvo. Neste contexto, destacam-se as bacteriocinas, frequentemente, com espectro de ação limitado e muito diversificadas, que diminuiriam a pressão seletiva indesejável (Riley & Wertz, 2002; Riley *et al.*, 2012).

Diversos estudos demonstram a utilização de bacteriocinas capazes de inibir organismos de grande relevância clínica. Por exemplo, o lantibiótico 3147 apresenta importante ação antibacteriana contra linhagens virulentas de interesse médico como MRSA e VRE (Sit & Vederas, 2008; Nes *et al.*, 2011; Hammami *et al.*, 2013). Quando a ação do lantibiótico haloduracina, produzido por *Bacillus halodurans*, contra VRE foi avaliada, observou-se melhor atividade do que a demonstrada para nisina. Além disto, a haloduracina mostrou-se mais estável ao pH fisiológico, o que eleva o potencial de aplicação terapêutica (Hammami *et al.*, 2013).

Salmonella enterica é um agente importante de enterite aguda, bacteremia e febre entérica e, atualmente, a resistência a drogas antimicrobianas é uma característica observada com relativa frequência no grupo. A microcina J25 foi avaliada em modelo murino contra linhagens da bactéria e observou-se redução marcante do número de organismos viáveis no baço e no fígado em relação ao grupo controle (Cotter *et al.*, 2013; Hammami *et al.*, 2013).

A administração de microcina 24 produzida por *E. coli* favoreceu a redução da colonização por *Salmonella enterica* Typhimurium em frangos adultos. Também, a enterocina A, produzida por *Enterococcus faecium*, foi capaz de agir contra *Salmonella*

em modelo animal de codornas japonesas *gnotobióticas* (Gillor *et al.*, 2009; Rebuffat, 2011b).

Podem ser citados também os estudos referentes aos lantibióticos salivaricina tipo A e tipo B, utilizados no tratamento de pacientes com infecções do trato respiratório superior associadas a *Streptococcus*, bem como da cárie dentária relacionada a *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. A halitose, associada a *Prevotella*, *Eubacterium saburreum* e *Micromonas micros* é combatida por uma goma de mascar que possui, em sua composição, a bacteriocina salivaricina tipo B, que ajuda a restabelecer a microbiota residente da cavidade oral (Gillor *et al.*, 2009).

Na vaginose, a microbiota indígena está alterada pelo aumento ou aparecimento de alguns microrganismos, tais como *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus* e *Bacteroides* e pela diminuição drástica de *Lactobacillus*. Este grupo é capaz de produzir bacteriocinas que inibem a multiplicação de *G. vaginalis*. Também foi demonstrado que bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus jensenii* 5L08 inibiram a multiplicação de *Candida albicans* (Gillor *et al.*, 2009).

Infecções do trato urinário acometem cerca de 150 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, principalmente mulheres. Um estudo avaliou a atuação de bacteriocinas sobre linhagens uropatogênicas de *E. coli*, mostrando a inibição e eliminação de biofilmes pré-existentes em catéter (Riley *et al.*, 2012).

Estudos mostram que o gene *wcfs1*, envolvido na produção e liberação de bacteriocina em linhagens *L. plantarum*, parece atuar nas células dendríticas e nas células mononucleares do sangue periférico, influenciando a atuação do sistema imune (Cotter *et al.*, 2013).

S. flexneri, importante agente diarreiogênico, foi inibido pela microcina Mcc7/C51, produzida pela linhagem de *E. coli* H22. Outra amostra de *E. coli*, produtora da microcina Mcc24, inibiu a multiplicação de *S. enterica* e *E. coli* O157:H7 presentes no trato intestinal de galinhas. Estudos adicionais ainda se fazem necessários para definir como as microcinas contribuem para a prevenção das infecções intestinais (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011b; Hammami *et al.*, 2013).

A microcina S, produzida pela linhagem de *E. coli* G3/10 (uma das seis linhagens presentes no probiótico Simbioflor 2), foi capaz de inibir a aderência de *E. coli* enteropatogênica a células epiteliais. Entretanto, o efeito não foi observado para

linhagens da bactéria que expressavam o gene de imunidade para a microcina S (Cotter *et al.*, 2013).

Além da ação direta contra outras bactérias, as bacteriocinas podem atuar contra células eucarióticas. Em estudo de um modelo contraceptivo, nisina e subtilosina, uma bacteriocina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, desempenharam atividade espermicida em alguns modelos animais (Dicks *et al.*, 2011; Chikindas *et al.*, 2018). A microcina Mcc492 apresentou atividade na promoção de apoptose, por induzir alterações morfológicas e bioquímicas na célula alvo, o que desperta grande interesse para a possibilidade de aplicação da substância como agente antitumoral (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011b; Cotter *et al.*, 2013; Kaur & Kaur, 2015). Além disso, foi observado que bacteriocinas da classe IIa sintetizadas por bactérias Gram positivas apresentaram atividade antineoplásica e antiviral (Lohans & Vederas; 2012; Chikindas *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

5 A doença diarreica aguda é um problema de saúde pública, que acomete, principalmente, crianças com idade inferior a cinco anos que vivem em países em desenvolvimento, associado a taxas elevadas de morbidade e mortalidade. Entre os agentes diarreiogênicos, destaca-se o gênero *Shigella*, em decorrência da prevalência, baixa dose infectante e da gravidade do quadro clínico associado. A capacidade de
10 expressão de substâncias antagonistas de natureza proteica ativas, principalmente, contra espécies filogeneticamente relacionadas, é uma característica bastante disseminada entre bactérias. Tais substâncias podem atuar como uma habilidade de virulência, atuando contra a microbiota indígena no processo de instalação do patógeno ou como um mecanismo de sobrevivência no meio ambiente, por eliminar
15 outros membros bacterianos presentes. Considerando a relevância da doença diarreica, de *S. sonnei* como agente da doença e do papel das substâncias antagonistas, inclusive como fator de patogenicidade e como candidata a novos fármacos, desenvolvemos este trabalho que visou à purificação, ao sequenciamento e à identificação das substâncias antimicrobianas, bem como, ao isolamento e ao
20 sequenciamento de plasmídios colicinogênicos provenientes de uma amostra de *S. sonnei* ativa contra outro isolado da mesma espécie.

3 OBJETIVOS

5 3.1 OBJETIVO GERAL

10 Purificar, sequenciar e identificar substâncias antibacterianas e plasmídios colicinogênicos de uma amostra de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com enterite aguda.

15 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e purificar as substâncias antibacterianas obtida do extrato intracelular de *S. sonnei* SS9.
- Sequenciar as substâncias ativas purificadas.
- 20 - Identificar as substâncias após comparar as sequências dos resíduos de aminoácidos obtidas com as depositadas em bancos de dados.
- Isolar e sequenciar plasmídios colicinogênicos de *S. sonnei* SS9.
- Comparar e identificar as sequências de nucleotídios obtidas com as depositadas em bancos de dados.
- 25 - Identificar as colicinas.
- Verificar a capacidade de transferência horizontal dos plasmídios colicinogênicos.
- Verificar a produção de colicinas ativas codificada pelos plasmídios colicinogênicos.

30

4 MATERIAL E MÉTODOS

5 4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Duas amostras de *S. sonnei*, denominadas SS9 e SS12, foram empregadas como produtora de substância antagonista e reveladora da expressão do antagonismo, respectivamente. Foram isoladas de espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda, atendidas no Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG e em Teresina/ PI: estudo clínico e laboratorial”. As amostras pertencem à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e vêm sendo mantidas em Brucella Broth¹ acrescido de glicerol 10% em freezer -80 °C.

A amostra SS9 foi selecionada entre 10 amostras da espécie capazes de produzir substâncias antagonistas, por apresentar halos de inibição das amostras reveladoras maiores e mais límpidos. SS12 foi escolhida aleatoriamente entre sete amostras de *S. sonnei* que apresentaram sensibilidade à atividade antagonista expressada pela amostra produtora (Sousa *et al.*, 2010).

25

4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO INTRACELULAR

A amostra SS9 criopreservada foi submetida a três repiques sucessivos em TSA² e a cultura foi incubada a 37 °C, em atmosfera de aerobiose, por 24 h. Colônias

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Difco, Sparks, MD, EUA

obtidas do terceiro repique foram cultivadas em 20 mL de TSB³ e, após incubação nas mesmas condições descritas anteriormente, a cultura bacteriana foi vertida em 580 mL de TSB. Após 12 h de incubação, o material foi centrifugado a 16.200 x g, por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes em tampão

5 Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0 centrifugado e ressuspenso em 15 mL do mesmo tampão. A suspensão foi sonicada a 50 W, por 12 ciclos de 1 min, com intervalos de 30 s, em banho de gelo. Para comprovação da lise celular total, uma alíquota da suspensão sonicada foi submetida à coloração pelo método de Gram e o esfregaço foi examinado em microscópio óptico, tendo como controle uma outra lâmina preparada a partir do

10 tampão contendo as células antes da primeira sonicação. A suspensão foi centrifugada nas mesmas condições especificadas acima e o sobrenadante foi mantido em banho de gelo e submetido à precipitação proteica por meio de adição lenta e constante de sulfato de amônio em duas concentrações, 0-30 e 30-75% p/v, sob leve agitação. Após centrifugação a 29.830 x g, por 30 min, a 4 °C, os precipitados foram solubilizados em

15 tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0. Desta forma, foram obtidas os extratos intracelulares C-30 e C-75, com base em resultados prévios (Farias *et al.*; 1994; Moreira, 2011; Sousa *et al.*, 2013a; Moreira, 2014).

20 **4.2.1 DIÁLISE DOS EXTRATOS PROTEICOS INTRACELULARES**

C-30 e C-75 foram dialisados, em membrana de poros controlados, contra dois litros de tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, em câmara fria a 4 °C, por 24 h, realizando-se

25 três trocas de tampão neste intervalo de tempo. Os volumes foram medidos e, em seguida, os extratos foram filtrados em membrana com poro 0,45µm⁴, aliqüotados em microtubos e armazenados a -80 °C (Moreira, 2011; Sousa *et al.*, 2013a; Moreira, 2014).

³ Difco

⁴ Corning, Lowell, MA, EUA

4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS EXTRATOS C-30 E C-75

Uma alíquota de 10 µL dos extratos C-30 e C-75 foram gotejados sobre uma
5 camada de TSA. A placa foi exposta a vapor de clorofórmio por 30 min e, após
evaporação do clorofórmio residual, a camada de TSA foi recoberta com 3,5 mL de
TSA semissólido (TSB + 0,7% de ágar) acrescido de 10 µL de cultura da amostra
reveladora (TSB, 37 °C, aerobiose, 24 h). Após incubação nas mesmas condições
10 descritas, a leitura foi realizada pela verificação da presença ou ausência de halos de
inibição da amostra reveladora. Como controle, foi empregada água ultrapura⁵,
utilizada para solubilização de C-30 e C-75 (Farias *et al.*; 1992; Farias *et al.*; 1994).

4.2.3 TITULAÇÃO DOS EXTRATOS C-30 E C-75 ATIVOS

15 Os extratos C-30 e C-75 foram submetidos a diluições seriadas em água
ultrapura e 10 µL de cada diluição foram depositados sobre camada de TSA. Após
exposição a vapor de clorofórmio e evaporação do clorofórmio residual, por 30 min
20 cada, testes de antagonismo foram realizados conforme descrito em 4.2.2. O título,
definido como a recíproca da maior diluição que resulta em um halo límpido de inibição
da amostra reveladora, foi determinado. Em seguida, a atividade antibacteriana foi
calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA).mL⁻¹, empregando-se a fórmula “UA
= título x 1000 µL/v(µL)”, sendo v o volume do extrato utilizado no ensaio (Farias *et al.*,
25 1994; Batdorj *et al.*, 2006).

4.2.4 DOSAGEM PROTEICA

30 C-30 e C-75 foram avaliados em relação a concentração proteica, segundo
metodologia descrita por Bradford (1976), que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue*

⁵ Eppendorf, Molsheim, França

5 G-250⁶. O ensaio foi realizado em placa de poliestireno contendo 96 poços. Construiu-se uma curva padrão empregando-se 1 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg e 20 µg de soroalbumina bovina⁷. As amostras diluídas 1:10 foram depositadas na placa e, então, submetidas a diluições seriadas. Após adição do reativo de Bradford, a leitura foi realizada em absorvância de 595 nm e a concentração proteica foi calculada.

4.2.5 ATIVIDADE ESPECÍFICA

10 Os extratos intracelulares C-30 e C-75 foram avaliados em relação a atividade específica. Para tanto, o valor da atividade total foi dividido pelo valor de proteína total (Carvalho *et al.*, 2010).

15

4.3 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75

20 Etapas sequenciais de cromatografia líquida foram utilizadas para a purificação das biomoléculas, como padronizado em estudos anteriores (Farias *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2013a). O extrato C-75 foi utilizado para o prosseguimento dos ensaios de purificação e as frações geradas por cada etapa cromatografica foram selecionadas para as fases posteriores, com base em resultados previamente obtidos (Moreira, 25 2011; Moreira, 2014). Diversas corridas cromatográficas foram realizadas, mas só estão apresentadas as frações que foram purificadas ou parcialmente purificadas.

30

⁶ Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

⁷ Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil

4.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

O extrato C-75 foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™⁸ acoplada a sistema FPLC. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, com um fluxo de 60 mL.h⁻¹. Para eluição da amostra, foi utilizado o mesmo tampão acrescido de NaCl 1M, em gradiente linear de 0-100% em 60 min. A corrida foi monitorada a uma absorbância de 280 nm, em temperatura de, aproximadamente, 25 °C. Frações de 1,5 mL foram coletadas e liofilizadas (Everse & Stolzenbach, 1971), solubilizadas em água ultrapura e testadas para avaliação de atividade antagonista, como descrito no item 4.2.2. Após confirmação de atividade, as frações 1 a 7 foram empregadas para confecção de um *pool* (*pool* TI) e submetidas a titulação, dosagem proteica e atividade específica, conforme descrito nos itens 4.2.3, 4.2.4 e 4.2.5, respectivamente. O *pool* foi utilizado na próxima etapa de purificação.

4.3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

O *pool* TI foi submetido a cromatografia em coluna de exclusão molecular HR 10/30 Superose 12⁹ acoplada a sistema FPLC. Como fase móvel, foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, com fluxo de 30 mL.h⁻¹, sendo coletadas frações de 1,5 mL, que foram monitoradas a uma absorbância de 280 nm. Todo o ensaio cromatográfico foi realizado à temperatura de, aproximadamente, 25 °C. As frações foram liofilizadas, solubilizadas em água ultrapura e testadas quanto à expressão de antagonismo, como descrito no item 4.2.2. Após confirmação de atividade, os *pools* das frações 2 a 6 (*pool* GF1) e 7 a 9 (*pool* GF2), fração 10 (GF3) e fração 11 (GF4) foram submetidos a titulação (item 4.2.3), dosagem proteica (item 4.2.4) e atividade específica (item 4.2.5) e encaminhadas a cromatografias de fase reversa.

⁸GE Healthcare, Uppsala, Suécia

⁹ Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA

4.3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCO

Os *pools* e as frações ativas GF1, GF2, GF3 e GF4 obtidos da fase anterior de
5 purificação foram submetidos a cromatografia de fase reversa em coluna Supelco C8
(4,6 mm x 25 cm 5 μm)¹⁰ acoplada a sistema HPLC. A coluna foi previamente eluída
com solução B (acetonitrila¹¹ 80% v/v acrescida de TFA¹² 0,1%) e equilibrada com
solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). As frações foram eluídas com as
10 soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60 mL.h⁻¹, perfazendo um gradiente linear de 0 a
100%, utilizando o seguinte programa: 0-10 min, 100% da solução A; 10-40 min, 0-
100% da solução B e 40-50 min, 100% da solução B. A corrida foi monitorada usando-
se λ de 220 e 280 nm, com temperatura aproximada de 25 °C. As frações foram
coletadas em volume de 1 mL, liofilizadas, solubilizadas em 20 μL de água ultrapura e
15 avaliadas em relação a ação antagonista (4.2.2). As frações ativas B11 a B14, B15
obtidas do *pool* GF1; C1 a C3, C4 a C10 provenientes do *pool* GF2; B15 a C2
adquiridas da fração GF3; C1 a C2 originadas da fração GF4, foram denominadas,
respectivamente, RF1, RF2, RF3, RF4, RF5, RF6 e encaminhadas para a próxima
etapa da pesquisa.

20

4.3.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SEPHASIL™ PEPTIDE

As frações B11 a B14 (*pool* RF1), B15 (RF2), C1 a C3 (*pool* RF3), C4 a C10
25 (*pool* RF4), B15 a C2 (*pool* RF5) e C1 a C2 (*pool* RF6), oriundas da etapa anterior de
purificação, foram analisadas por recromatografia em coluna Sephasil™ Peptide C18
(4,6 mm x 25 cm 5 μm)¹³ acoplada a sistema HPLC, seguindo o mesmo protocolo
descrito no item 4.3.3. As frações obtidas foram processadas também como descrito
anteriormente (4.3.3) e avaliadas em relação a atividade antagonista (4.2.2). Frações
30 ativas foram encaminhadas para análise por espectrometria de massas.

¹⁰ Sigma-Aldrich

¹¹ Merck, Darmstadt, Alemanha

¹² Sigma-Aldrich

¹³ Life Technologies, Foster City, CA, EUA

4.3.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE AFINIDADE HEPARINA

Na busca por uma melhor estratégia de purificação de biomoléculas com
5 atividade antibacteriana, em especial a proteína ribossomal L29 isolada do extrato
intracelular de *S. sonnei*, purificada durante o desenvolvimento do meu mestrado
Moreira (2014), foi empregado o uso da cromatografia de afinidade em coluna de
heparina. A metodologia foi aplicada devido aos achados de Meyer-Hoffert e
colaboradores (2008), que isolaram do extrato pulmonar de camundongos a proteína
10 ribossomal L29, com amplo espectro de ação e capaz de interagir com heparina. Para
o presente estudo, o extrato C-75 foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna
HiTrap™ Heparin HP¹⁴, acoplada ao sistema FPLC, seguindo o mesmo protocolo
descrito no item 4.3.1. As frações obtidas foram dialisadas em tampão Tris-HCl 0,02 M,
pH 8,0, a atividade antagonista foi avaliada (4.2.2) e as frações ativas com perfil
15 cromatográfico favorável foram submetidas a confecção de *pools* que foram
cromatografados em coluna de troca iônica (4.3.1). As frações ativas foram
dessalinizadas, concentradas e purificadas em ponteiras Ziptips C18¹⁵, seguindo um
gradiente de 0-40%, 40-80% e 80-100% v/v de acetonitrila e encaminhadas para
análise por espectrometria de massas (4.4).

20

4.3.6 SS12 EMPREGADA COMO MATRIZ DE AFINIDADE

25 *S. sonnei* SS9 foi cultivada em meio TSB, a 37 °C, por 12 h, em atmosfera de
aerobiose. A cultura foi centrifugada a 16.500 x g, por 15 min, a 4°C e o sobrenadante
filtrado para esterilização (0,22 µm). *S. sonnei* SS12 foi cultivada em meio TSB e
ajustada em espectrofotômetro usando um λ de 625 nm até a OD de 0,08 a 0,10. Em
um erlenmeyer estéril, foram depositados o sobrenadante filtrado da cultura de SS9 e o
30 mesmo volume da cultura de SS12. A amostra foi homogeneizada e distribuída, em
duplicata, de maneira estéril, em tubos previamente identificados. Os tubos foram

¹⁴Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA

¹⁵Sigma-Aldrich

incubados a 37 °C, em atmosfera de aerobiose, e em tempos pré-determinados de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 26 e 48 h, a amostra foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima. O sedimento foi lavado por duas vezes com água destilada estéril, ressuspendido e sonicado (4.2). As amostras foram concentradas a vácuo, avaliadas em relação à atividade antagonista (4.2.2) e tituladas (4.2.3). Uma amostra selecionada foi cromatografada em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 (4.3.4). As frações foram avaliadas em relação à ação antagonista e as que apresentaram atividade foram analisadas por espectrometria de massas (4.4).

Para confirmar que a ação antagonista não foi proveniente de SS12, a amostra reveladora foi cultivada, centrifugada, lavada por duas vezes com água destilada estéril e sonicada, como descrito acima. Uma alíquota da cultura, do sobrenadante da cultura, das células lavadas e da amostra lisada foram concentradas e analisadas em relação à ação antagonista. Como controle positivo, SS9 foi avaliada (4.2.2)

4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As frações selecionadas provenientes das últimas etapas de cromatografia foram encaminhadas para análise em espectrometria de massas. Assim, as frações foram liofilizadas, solubilizadas em solução de TFA 0,1% e adicionadas em matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -ciano), ácido sinapínico e 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) na proporção de 1:1. Um volume de 1 μ L/spot foi depositado em placa de aquisição de dados do MALDI (MTP AnchorChips 400 X 384)¹⁶, a qual foi mantida à temperatura ambiente. Para determinação da massa molecular, foi empregado o Autoflex® III MALDI-TOF/TOF¹⁷ operado no modo linear positivo e negativo. Para a calibração linear, foram utilizados os calibrantes *Peptide Calibration Standard mono, Protein 1 Calibration Standard* e *Protein Calibration Standard II*¹⁸ e, para a análise dos dados, foi empregado o programa *Flex Analysis*¹⁹.

¹⁶Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

¹⁷Bruker Daltonics

¹⁸Bruker Daltonics

¹⁹Bruker Daltonics

4.5 REDUÇÃO, ALQUILAÇÃO E TRIPSINÓLISE DAS AMOSTRAS PURIFICADAS

A concentração proteica das frações ativas purificadas foi estimada em equipamento Nanodrop 1000²⁰ com leitura em absorbância de 280 nm. Em seguida, as amostras foram concentradas a vácuo²¹ e ressuspensas em 18 µL de solução 1 (200 mM bicarbonato de amônio²², 6M ureia²³ e 2M tiourea²⁴), 5 µL de solução 2 (50 mM DTT²⁵ e 100 mM bicarbonato de amônio) e incubadas por 3 h a 25 °C. Após o período de incubação, foram adicionados às amostras 5 µL de solução 3 (100 mM iodoacetamida²⁶ e 100 mM bicarbonato de amônio), sendo essas novamente incubadas, protegidas da luz, por 30 min, a 25 °C. As frações foram diluídas 6X em água ultrapura e o pH, com valor ideal de 7,5 a 8,0, foi avaliado com o auxílio de tiras indicadoras de pH²⁷. As amostras foram acrescidas de tripsina²⁸ 1 mg/100 mg de proteína e incubadas a 37 °C, por 16 h. Após esse período, as amostras foram incubadas a -80 °C para interromper a reação. Os fragmentos obtidos foram tratados em ponteira Ziptip C18 e avaliados por espectrometria de massas (Oliveira, 2013).

4.6 SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS

As frações ativas purificadas e parcialmente purificadas, provenientes dos ensaios de tripsinólise (4.5), foram sequenciadas por fragmentação PSD ou ISD em espectrômetro de massas. As sequências obtidas foram analisadas no *web software* BLAST, subaplicação Protein BLAST

²⁰Thermo Scientific

²¹Univapo 100H, UniEquip, Munich, Alemanha

²²Synth, Diadema, SP, Brasil

²³USB, Cleveland, OH, EUA

²⁴Merck Milipore, Darmstadt, Alemanha

²⁵Sigma

²⁶Sigma

²⁷Merck

²⁸Promega, Madison, WI, EUA

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), para verificação de similaridade com outras proteínas.

5

4.7 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO DNA EXTRACROMOSSÔMICO DE *S. sonnei*

10

4.7.1 EXTRAÇÃO DE DNA

S. sonnei SS9 foi cultivada em meio TSB, a 37°C, em atmosfera de aerobiose, até a densidade óptica de 0,08 a 0,10 em absorvância de 625 nm. A cultura foi centrifugada a 3.000 x g por 15 min e o sedimento encaminhado para a extração do DNA extracromossômico utilizando o kit comercial *GeneaidTM Plasmid Maxi (Endotoxin Free)*²⁹, seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por dosagem em equipamento NanoDrop 1000, empregando-se comprimento de onda de 260 nm. O perfil de DNA da amostra foi avaliado em gel de agarose 0,7% (m/v) preparado em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA), sob corrente de 75 V, com duração de corrida de 2 h. O gel foi corado com GelRed^{TM30} acrescido de TBE e as bandas estimadas por comparação com o padrão de massa molecular GeneRulerTM DNA Ladder Mix # SM0331/2/3³¹.

25

4.7.2 PRODUÇÃO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO

Para o ensaio, foi empregado o sequenciamento de nova geração (NGS) em plataforma Illumina. As bibliotecas de DNA foram preparadas pelos passos de quantificação do DNA extracromossômico de *S. sonnei* SS9 utilizando-se o *kit Qubit ds*

²⁹Geneaid, New Taipei, TW, China

³⁰Biotium, Houston, TX, EUA

³¹Fermentas, Life Sciences, Alemanha

5 DNA HS assay³² em equipamento *Qubit 2.0 fluorometer*³³, fragmentação enzimática das moléculas utilizando o kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*³⁴ e preparação dos fragmentos gerados no formato *paired-end*, produzindo *reads* pareadas. A análise das *reads* foi realizada no sequenciador *Illumina* versão *Miseq*³⁵ utilizando o *kit* de sequenciamento V3³⁶ (600 ciclos).

4.7.3 PRÉ- PROCESSAMENTO E MONTAGEM DOS CONTIGS

10 A qualidade do sequenciamento foi determinada pela análise das *reads*, empregando o *software* FastQC, utilizando como ponto de corte as leituras que geraram qualidade abaixo de *phred* 30, sendo essas descartadas. As *reads* selecionadas foram processadas utilizando o algoritmo SPAdes 3.10.1 que gerou por
15 *scaffolds* a montagem dos *contigs*.

4.7.4 ANÁLISE DOS DADOS

20 As fases de leitura aberta (ORFs) presentes nos *contigs* foram identificadas utilizando o programa Artmis³⁷. A análise, por similaridade, dos *contigs* e das ORFs anotadas foram realizadas empregando o banco de dados *Genbank*, ferramenta *Blastx* e *Blastp*. O mapa genético dos plasmídios foi gerado no programa SnapGene[®] Viewer
25 2.8.1.

³²Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA, EUA

³³ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA

³⁴Illumina, San Diego, CA

³⁵Illumina

³⁶Illumina

³⁷Sanger Institute, UK, Inglaterra

4.8 BUSCA POR COLICINAS SINTETIZADAS POR *S. sonnei*

4.8.1 SDS-PAGE

5

Durante o desenvolvimento do meu mestrado (Moreira, 2014), foi observado, nos géis de poliacrilamida corados por prata e revelados *in situ*, duas bandas proteicas, produzidas pelos extratos intracelulares de SS9, precipitado com 30% e 75% p/v de sulfato de amônio, C-30 e C-75. A análise da espessura das bandas, em gel de poliacrilamida revelado *in situ*, demonstra uma maior concentração das substâncias quando precipitadas com 30%p/v de sulfato de amônio, motivo pelo qual foi empregado o extrato C-30 para o ensaio.

O perfil eletroforético de C-30 foi analisado em gel de poliacrilamida 12,5%. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V, à temperatura ambiente e, após a corrida, o gel foi corado por prata. Como padrão de massa molecular, foi utilizado *Protein Ladder* (#SM0661)³⁸ e, após coloração, as bandas proteicas foram estimadas através do programa *KODAK Gel Logic Imaging System* (Tunon & Johansson, 1984; Rosenberg, 1996; Alfenas & Brune, 1998; Moreira, 2014).

20

4.8.2 GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO *IN SITU*

O padrão pré-corado *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (#1610374)³⁹, as amostras proteicas e o extrato C-30 foram submetidos à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5%, a 120 V, à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi descontaminado com uma solução de isopropanol 20%⁴⁰ e ácido acético 10%⁴¹, sob agitação, por 2 h e, a seguir, lavado seis vezes (30 min/vez) com água destilada estéril. O gel foi depositado, sob condições assépticas, em uma placa

30

³⁸ EUAThermo Scientific, West Palm Beach, FL, EUA

³⁹Bio-Rad, EUA

⁴⁰Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴¹Vetec,

de Petri, sobre uma camada de TSA e, então, recoberto com 20 mL de TSA semissólido acrescido de 60 µL de cultura de *S. sonnei* SS12. A placa foi incubada a 37 °C, por 24 h, em aerobiose e a leitura foi realizada pela avaliação da presença de linhas de inibição da amostra reveladora (Farias *et al.*, 1994; Alfenas & Brune, 1998; 5 Moreira, 2014).

10 4.9 CONJUGAÇÃO E ANÁLISES DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

O ensaio de conjugação foi realizado para verificar a capacidade de transferência dos plasmídios colicinogênicos por conjugação, bem como a capacidade de produção de moléculas bioativas por células transconjugantes.

15

4.9.1 ESCOLHA DA AMOSTRA RECEPTORA

20 Para a escolha da amostra receptora a ser empregada no ensaio de conjugação, foi realizado o teste de difusão em sobrecamada (Booth *et al.*, 1977), utilizando um painel de três amostras, *E. coli* K12 Row, *E. coli* ATCC 25922 e *S. flexneri* ATCC 12022. As amostras fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e vêm sendo mantidas em freezer -80 °C.

25 As amostras supracitadas, SS9 e SS12, foram cultivadas em meio TSA, a 37 °C, em atmosfera de aerobiose, por 24 h. As colônias foram submetidas à coloração pelo método de Gram, para a verificação da pureza das mesmas. Todas as amostras foram inoculadas, separadamente, em caldo TSB, e incubadas nas mesmas condições. A concentração de cada cultura foi ajustada para leitura de 0.08 a 0.10 usando λ de 30 625 nm (CLSI, 2003). Alíquotas das amostras foram avaliadas pelo ensaio de atividade antagonista (item 4.2.2), analisadas como produtoras da ação antagonista e como reveladoras da expressão antagonista (QUADRO 1).

Quadro 1

Avaliação da atividade antagonista e da suscetibilidade celular frente à substância antagonista para a seleção de uma amostra receptora para o teste de conjugação.

Produtora de substância antagonista	Reveladora da expressão de antagonismo				
	<i>S. sonnei</i> SS9 ^b	<i>S. sonnei</i> SS12	<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	<i>E. coli</i> K12 Row	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>E. coli</i> K12 Row ^a	T ^c	T	NT	NT	NT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	T	T	NT	NT	NT
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	T	T	NT	NT	NT
<i>S. sonnei</i> SS9	NT ^d	CP ^e	T	T	T

^a, amostras avaliadas como produtoras de substância antagonista; ^b, amostras testadas como reveladoras da expressão de antagonismo; ^c, teste realizado; ^d, não testado; ^e, controle positivo.

4.9.2 ANTIBIOGRAMA

As amostras *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922 foram empregadas no ensaio de antibiograma por método de disco difusão. *E. coli* ATCC 25922 é recomendada, pelo CLSI 2018, como amostra controle para os ensaios de antibiograma que envolvam membros da família *Enterobacteriaceae*. No presente estudo, ela também foi empregada como candidata à receptora no processo de conjugação.

Para o ensaio, foi empregado um painel de 19 fármacos antimicrobianos, das seguintes classes: penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta gerações, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, monobactâmicos, anfenicóis e sulfonamidas. Os discos foram selecionados com base na resistência aos antimicrobianos conferida por plasmídios.

Para o teste, foram dispensados 50 mL de *Mueller Hinton Agar*⁴²/placa 150x30 mm e, após a solidificação do meio, as amostras *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922,

⁴²Difco

ambas cultivadas em *Mueller-Hinton Broth*⁴³, ajustadas em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, foram semeadas com o auxílio de *swab*. Os discos de antimicrobianos foram depositados na superfície do meio e o material foi incubado a 37 °C, por 16 h, em aerobiose. A leitura foi realizada pela observação
5 macroscópica da presença de halo de inibição e medição, com paquímetro, de cada halo (CLSI, 2003; CLSI, 2018).

4.9.3 CONJUGAÇÃO

10
S. sonnei SS9 foi empregada nesse ensaio para verificar a capacidade de transferência, por conjugação, dos plasmídios colicinogênicos, bem como uma estratégia para tentar isolá-los. A amostra de *E. coli* ATCC 25922 foi avaliada como
15 receptora de tais plasmídios.

As amostras em estudos foram inoculadas em 2 mL de caldo Penassay⁴⁴ e incubadas por 24 h, sem agitação, em atmosfera de aerobiose, a 37 °C. As culturas foram ajustadas em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, e diluídas 1:50 v/v, com volume final de 3 mL, no mesmo caldo. Os tubos foram
20 incubados em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 3 h, sob agitação a 300 rpm. As culturas foram diluídas, no mesmo caldo, na proporção 1:10 v/v. Um volume de 1 mL das culturas das amostras produtora e receptora foram, então, misturadas em tubo de ensaio esterilizado. As amostras foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C. Nos intervalos de tempo 0, 15 e 30 min, 1, 3, 5 e 24 h, alíquotas de 100 µL foram
25 semeadas em MacConkey Agar⁴⁵ acrescido de ampicilina⁴⁶ 32 µg/mL. As mesmas amostras foram diluídas 1:10 v/v em Caldo Penassay e 100 µL foram semeados em meio sem droga antibacteriana. Como controle, 100 µL das amostras produtora e receptora foram inoculadas no mesmo meio com e sem ampicilina. As placas foram incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 24 h. A leitura foi realizada pela
30 contagem das colônias lactose positivas (Watanabe & Fukasawa, 1960).

⁴³ Difco

⁴⁴ Difco

⁴⁵ Difco

⁴⁶ Sigma-Aldrich

4.9.4 CONFIRMAÇÃO DO RESULTADO DA CONJUGAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

5 Para assegurar a ausência de colônias de *Shigella* nas amostras recuperadas no ensaio de conjugação, as colônias lac⁺ foram estriadas em MacConkey Agar e incubadas em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 24 h. As colônias de *E. coli* obtidas foram cultivadas em TSA, nas mesmas condições descritas anteriormente. Um clone das amostras em estudo foi obtido usando a técnica de plaqueamento de réplicas
10 (Lederberg & Lederberg, 1952). O ensaio de atividade antagonista foi realizado com a placa réplica, conforme item 4.2.2. Amostras de *E. coli* transconjugantes que expressaram antagonismo vêm sendo mantidas criopreservadas em Brucella Broth acrescido de glicerol 10%, em freezer -80 °C.

15

4.9.5 EXTRAÇÃO DE DNA EXTRACROMOSSÔMICO E ELETROFORESE

20 Para confirmar a transferência do DNA extracromossômico por conjugação, foi realizado o ensaio de extração do DNA, utilizando-se o *kit 96 Well Plasmid Kit*⁴⁷, com algumas modificações, e visualização em gel de agarose.

25 As amostras *S. sonnei* SS9, *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* transconjugante foram cultivadas em meio TSA, em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 24 h. As colônias obtidas foram ressuspendidas em água ultrapura estéril, centrifugadas por 10 min, a 3.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspendido em 100 µL de tampão PD1. Às amostras, foram adicionados 100 µL de tampão PD2 e o material foi incubado por 2 min a 25 °C. Um volume de 150 µL de tampão PD3 foi adicionado às amostras e, após homogeneização por inversão, o material foi centrifugado por 10 min, a 3.000 x g. Os sobrenadantes foram transferidos para uma
30 placa de plasmídeo acoplada a uma placa coletora e o material foi centrifugado como especificado anteriormente. Sobre os filtros da placa de plasmídeo, foram adicionados 250 µL de tampão W1. A seguir, a placa foi novamente centrifugada e, nos poços da

⁴⁷Geneaid, New Taipei City, Taiwan

placa, foram adicionados 250 µL de tampão de lavagem. Após centrifugação por 15 min, a 3.000 x g, a placa de plasmídeo foi acoplada em uma nova placa coletora e aos filtros da placa foram adicionados 50 µL de água ultrapura estéril. Após 2 min, a placa foi centrifugada por 5 min, a 3.000 x g, e os filtrados contendo o DNA plasmidial foram transferidos para os tubos plásticos estéreis.

Os produtos obtidos da extração plasmidial e o padrão de massa molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3⁴⁸ foram acrescidos de corante para DNA GelRed™⁴⁹ e submetidos à eletroforese em gel de agarose⁵⁰ 0,7% (m/v) preparado com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA). A corrida eletroforética foi realizada em cuba contendo tampão TBE, sob corrente de 75 V, por aproximadamente 2 h e 15 min. Após a corrida, o perfil do DNA extracromossômico foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

15 **4.9.6 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA DE UMA AMOSTRA TRANSCONJUGANTE**

Com base nos testes de atividade antagonista e perfil eletroforético em gel de agarose 0,7%, a amostra transconjugante 9 foi escolhida para a avaliação da síntese de substância antagonista em relação ao tempo de cultivo.

A amostra escolhida foi cultivada em TSA, a 37°C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Colônias obtidas foram transferidas para caldo TSB e incubadas nas mesmas condições, por 12 h. A cultura foi ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm, leitura de 0,08 a 0,10, fracionada em tubos pré-identificados e incubada. Em seguida, a amostra do tubo 1 foi submetida a leitura da densidade optica, uma alíquota da cultura foi centrifugada e o sobrenadante avaliado em relação a ação antagonista e titulação (itens 4.2.2 e 4.2.3). Uma outra alíquota foi diluída em salina 0,85%, 100 µL da diluição 10⁻⁹ foi plaqueada, em duplicata, em meio TSA e incubadas. Os mesmos passos foram realizados para os demais tubos, respeitando o intervalo de tempo, 20 min entre cada tubo, por 9 h. A leitura da curva de crescimento foi realizada

⁴⁸Fermentas, Life Sciences, Alemanha

⁴⁹Biotium, Houston, TX, EUA

⁵⁰Kasvi, Curitiba, PR, Brasil

pela contagem do número de colônias em relação ao tempo e a síntese de composto(s) antagonista(s) foi determinada durante a curva de crescimento bacteriano.

5 **4.9.7 SDS-PAGE**

O perfil proteico do sobrenadante do transconjugante 9 foi avaliado em gel de poliacrilamida corado por prata. A amostra foi cultivada em meio TSB, em atmosfera de aerobiose, a 37 °C, por 24 h. A cultura foi centrifugada a 10.000 x g, por 30 min, a 4 °C, o sobrenadante foi filtrado em membrana com poro de 0,22 µm⁵¹ e a expressão antagonista foi determinada (item 4.2.2). O sobrenadante estéril foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5%, corado por prata, como descrito no item 4.8.1. Como padrão de massa molecular, foi utilizado *Protein Ladder* (#SM0661)⁵² e como controle, o meio de cultura TSB.

4.9.8 GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO *IN SITU*

O sobrenadante da amostra transconjugante 9, o padrão pré-corado *Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards* (#1610374) e o meio de cultura TSB foram submetidos a corrida eletroforética, como descrito no item 4.9.7. Após a corrida, o gel foi descontaminado e revelado conforme apresentado no item 4.8.2. A análise do resultado foi dada pela observação da ausência ou presença de linha de inibição da amostra reveladora e estimativa da massa molecular por comparação com o padrão de massa molecular pré-corado.

⁵¹Millex, Bedford, MA, EUA

⁵²EUAThermo Scientific, West Palm Beach, FL, EUA

4.10 TRANSFORMAÇÃO

O teste foi realizado para isolar os plasmídios colicinogênicos e verificar a expressão antagonista contra SS12.

4.10.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS ELETROCOMPETENTES

A preparação de células eletrocompetentes foi realizada como descrito no protocolo do equipamento MicroPulser^{TM53}. Para o ensaio, foi empregada a linhagem *E. coli* BL21 (DE3)⁵⁴.

A amostra bacteriana foi inoculada em 500 mL de caldo LB⁵⁵ e incubada em atmosfera de aerobiose, por 24 h, a 37 °C. Para verificar a pureza da amostra, o ensaio de coloração pelo método de Gram foi realizado. A cultura foi diluída em uma proporção de 1:100 v/v, no mesmo caldo, e incubada a 37 °C, com agitação de 300 rpm, até a obtenção de uma leitura 0,8 a 0,10 em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm. A amostra foi incubada em banho de gelo, por 20 min, centrifugada a 4000 x g, por 15 min, a 4 °C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 500 mL de uma solução estéril e gelada de água ultrapura e glicerol 10%. Os passos de centrifugação e ressuspensão celular foram repetidos, por mais três vezes, utilizando-se, respectivamente, os volumes de 250, 20 e 1 mL da mesma solução. A amostra foi alíquotada em microtubos de plástico gelados e estéreis, em volume de 50 µL e armazenadas em freezer a -80 °C. Uma alíquota de 10 µL da linhagem eletrocompetente foi analisada quanto à ação antagonista contra a amostra reveladora (item 4.2.2).

⁵³ Bio-Rad, Hercules, CA, EUA

⁵⁴ Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil

⁵⁵ Fórmula Difco

4.10.2 TRANSFORMAÇÃO

Inicialmente, o DNA extracromossômico da bactéria produtora foi extraído utilizando-se o *96 Well Plasmid Kit* (item 4.9.5). O produto obtido foi dosado em equipamento Nanodrop⁵⁶ utilizando-se o comprimento de onda de 260 nm. A eletroporação foi realizada seguindo o protocolo do equipamento MicroPulserTM, com algumas modificações.

Para o ensaio de eletrotransformação, o microtubo contendo a amostra eletrocompetente *E. coli* BL21 (DE3) foi acondicionado em banho de gelo e, a ele, foram adicionados 50 ng do DNA extracromossômico. A amostra foi transferida para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad) de 0,2 cm, estéril, gelada e a ela foi aplicado um pulso elétrico de 2,5 kV, utilizando-se um eletroporador MicroPulserTM. A amostra foi ressuspensa em 500 µL de caldo SOC⁵⁷ pré-aquecido a 37 °C e transferida para um tubo estéril. O tubo foi incubado por 1 h, a 37 °C, com agitação de 225 rpm. Um volume de 100 µL foi inoculado, por espalhamento, em ágar SOB⁵⁸ pré-aquecido contendo 32 µg/mL de ampicilina e o mesmo volume da amostra diluída 1:500 v/v, no mesmo caldo, foi semeado em ágar SOB sem antimicrobiano. As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em atmosfera de aerobiose. A leitura foi realizada pela contagem de colônias.

4.10.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA PELAS CÉLULAS TRANSFORMADAS

As colônias da amostra transformada *E.coli* BL21 (DE3) recuperadas em Ágar SOB com e sem antimicrobiano foram removidas com auxílio de uma alça bacteriológica e cultivadas, em duplicada, em meio TSA, por 24 h, a 37 °C, em atmosfera de aerobiose. Após coloração pelo método de Gram, o ensaio de atividade

⁵⁶ Bio-Rad

⁵⁷ Difco

⁵⁸ Difco

antagonista (item 4.2.2) foi realizado com uma das réplicas e a outra cópia foi inoculada em Caldo Brucella contendo 10% de glicerol e criopreservadas a -80 °C.

5 **4.10.4 PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDIOS COLICINOGÊNICOS**

As bandas B e C, correspondentes aos plasmídios colicinogênicos 2 e 3, geradas por eletroforese do DNA extracromossômico da bactéria produtora (item 4.9.5) foram excisadas do gel com o auxílio de um bisturi, transferidas para tubos de plástico e purificadas com o *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit #K0513*⁵⁹, de acordo as instruções do fabricante. Para a purificação, as porções dos géis foram pesadas e, então, adicionou-se solução de solubilização (três volumes do peso do gel). Os tubos foram incubados a 55 °C até a completa solubilização do gel e um volume de isopropanol⁶⁰ a 100%, referente ao peso inicial do gel, foi adicionado às amostras. O material foi transferido para uma coluna previamente preparada e acoplada ao tubo coletor. As amostras foram centrifugadas por 1 min a 16.000 x g, o filtrado foi descartado e, ao filtro da coluna, foram adicionados 700 µL de solução de lavagem. Após duas etapas de centrifugação, como especificado anteriormente, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e, ao filtro de cada coluna, foram adicionados 50 µL de ultrapura estéril. Após 1 min, o material foi novamente centrifugado e o DNA plasmidial recuperado no interior do tubo coletor. A pureza dos plasmídios colicinogênicos 2 e 3 foram determinadas por eletroforese (item 4.9.5)

25 **4.10.5 TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO OS PLASMÍDIOS COLICINOGÊNICOS ISOLADOS, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E ANTIBIOGRAMA**

30 Os plasmídios colicinogênicos 2 e 3, purificados, foram submetidos ao ensaio de transformação (item 4.10.2). Como receptora, foi empregada a bactéria

⁵⁹ Thermo Scientific

⁶⁰ Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

eletrocompetente *E. coli* BL21 (DE3) (item 4.10.1). Os transformantes foram cultivados em meio SOB sem antimicrobiano e, então, os ensaios para avaliação de atividade antagonista (itens 4.2.2 e 4.10.3) e antibiograma utilizando os discos de ampicilina e sulfametaxazol-trimetropim (item 4.9.2) foram realizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 5.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO PROTEICA, TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA, DOSAGEM PROTEICA E ATIVIDADE ESPECÍFICA

Após diálise, foram obtidos, respectivamente, 12 mL e 23 mL dos extratos intracelulares C-30 e C-75 da amostra *S. sonnei* SS9. Os títulos de atividade antagonista dos extratos C-30 e C-75 contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12 foram $5,5 \times 10^{14}$ e $3,6 \times 10^{18}$ UA/mL, respectivamente. A dosagem proteica e a atividade específica foram, respectivamente, de 65 mg/mL e $8,5 \times 10^{12}$ UA/mL para o extrato C-30, e 113 mg/mL e $3,2 \times 10^{16}$ UA/mL para o extrato C-75 (TAB.1).

15

5.2 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75

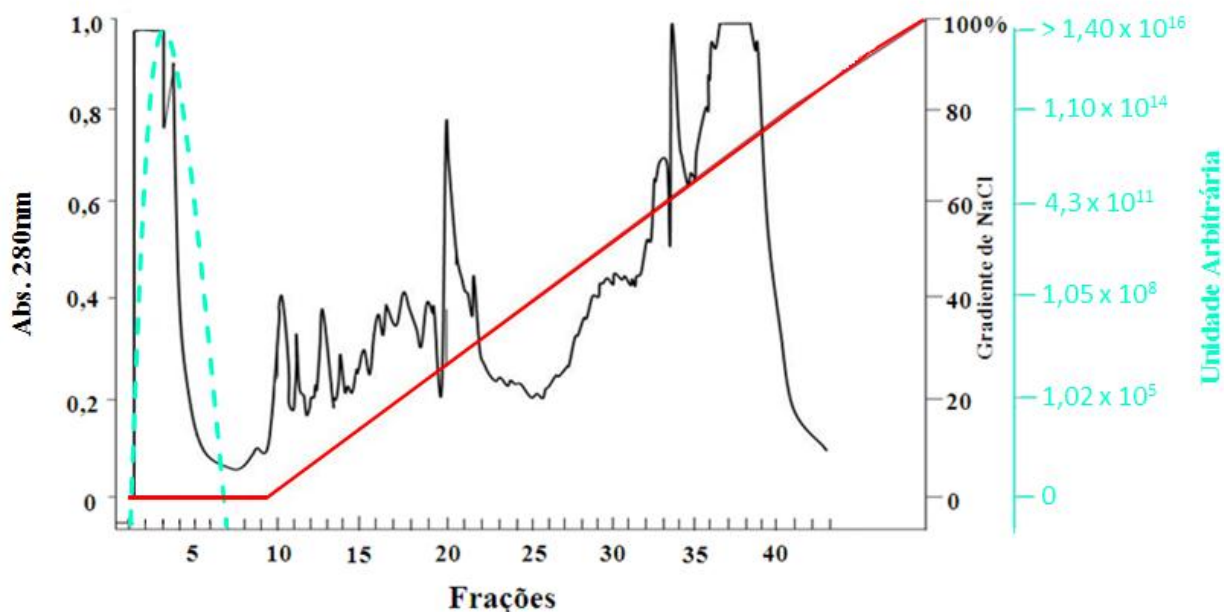
20

5.2.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

O extrato C-75, que apresentou maior atividade foi, inicialmente, cromatografado em coluna de troca iônica Mono QTM, gerando 40 frações ativas contra a amostra reveladora SS12 (FIG. 1). As frações 1 a 7, que não interagiram com a coluna, geraram halos de inibição maiores e límpidos e foram utilizadas para a confecção do *pool* TI, que foi liofilizado e ressuspenso em água ultrapura. Os títulos de atividade antagonista, atividade total, dosagem proteica, proteína total e atividade específica do *pool* TI estão apresentados na tabela 1. Com base nesses resultados e em dados anteriores (Moreira, 2014), o *pool* TI foi selecionado para análise por cromatografia em coluna de exclusão molecular.

30

Figura 1. Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Mono Q™ da fração intracelular C-75 de *Shigella sonnei* SS9 precipitada a 75% de sulfato de amônio.



5

Cromatografia em coluna de troca iônica Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™ (GE Healthcare) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão, com fluxo de 1,0 mL mL/min, leitura em Abs = 280 nm.

10 Em ciano, título de atividade antagonista do *pool* TI (frações 1 a 7); amostra reveladora:

S. sonnei SS12.

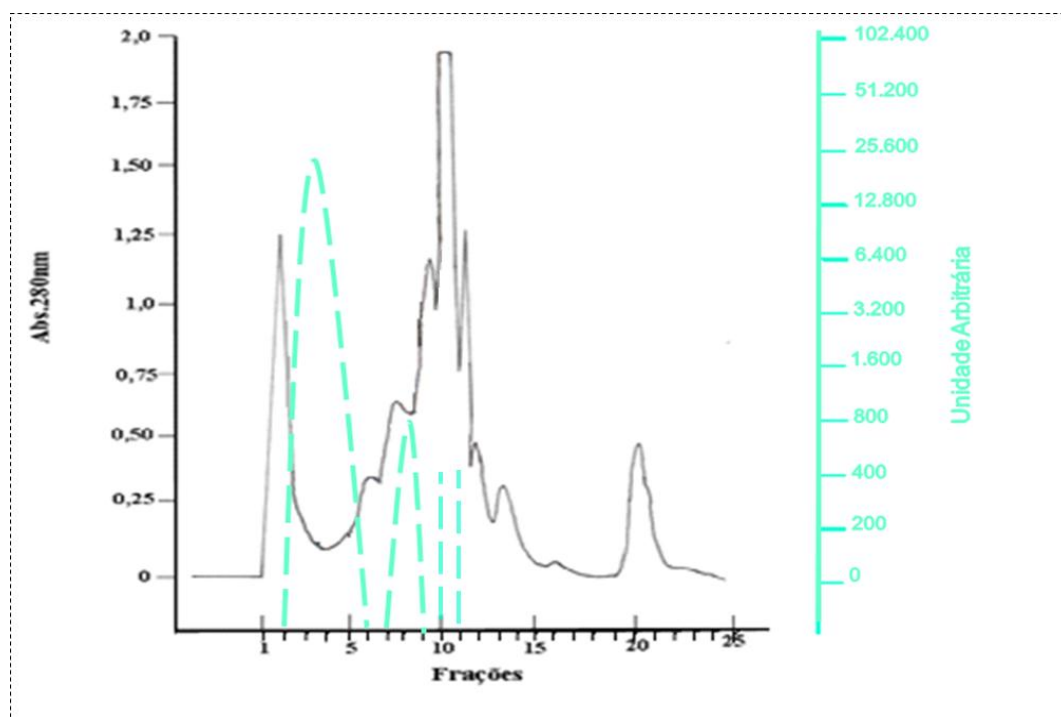
5.2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

15

A análise em coluna de exclusão molecular HR 10/30 Superose 12 do *pool* TI gerou 25 frações. As frações 2 a 15 apresentaram ação antagonista contra SS12, no entanto, as frações 2 a 11 apresentaram os melhores resultados de purificação. Com base no perfil cromatográfico e na atividade antagonista, as frações 2 a 6 e 7 a 9 foram

utilizadas para a confecção dos *pools* GF1 e GF2 e as frações 10 e 11 foram identificadas como GF3 e GF4, respectivamente. Os *pools* e as frações GF1, GF2, GF3 e GF4 apresentaram, respectivamente, título de atividade antagonista de 25.600, 800, 400 e 400 UA/mL (FIG. 2, TAB. 1). Os ensaios de atividade total, dosagem proteica, proteína total e atividade específica de GF1, GF2, GF3 e GF4 também foram realizados e estão listados na tabela 1. As amostras supracitadas foram selecionadas para os próximos passos cromatográficos.

10 Figura 2. Perfil cromatográfico do *pool* TI em coluna de exclusão molecular Superose 12 HR 10/30.



15 Cromatografia em coluna de exclusão molecular Superose 12 do *pool* TI (frações 1 a 7) obtido da cromatografia de troca iônica do extrato intracelular precipitado em 75% de sulfato de amônio da amostra de *Shigella sonnei* SS9. Em ciano, título de atividade antagonista dos *pools* GF1 (frações 2 a 6) e GF2 (frações 7 a 9); GF3 (fração 10) e GF4 (fração 11); amostra reveladora: *S. sonnei* SS12

Tabela 1

Volume, titulação da atividade antagonista, atividade total, dosagem proteica, proteína total e atividade específica dos extratos C-30 e C-75 e das frações e do *pools* das frações parcialmente purificadas produzidas por *Shigella sonnei* SS9

Amostra	Volume (ml)	Titulação da atividade antagonista (UA/mL)	Atividade total (UA)^a	Dosagem proteica (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (UA/mg)
C-30	12	$5,5 \times 10^{14}$	$6,6 \times 10^{15}$	65	780	$8,5 \times 10^{12}$
C-75	23	$3,6 \times 10^{18}$	$8,3 \times 10^{19}$	113	2599	$3,2 \times 10^{16}$
<i>Pool</i> das frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica Mono-Q™	8	$1,4 \times 10^{16}$	$1,1 \times 10^{17}$	24	192	$5,7 \times 10^{14}$
<i>Pool</i> das frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular Superose 12	3	$2,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	17	51	$1,5 \times 10^3$
<i>Pool</i> das frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular Superose 12	1,8	800	$1,4 \times 10^3$	0,9	1,6	$8,7 \times 10^2$
Fração 10 da cromatografia de exclusão molecular Superose 12	0,6	400	$2,4 \times 10^2$	0,3	0,2	$1,2 \times 10^3$
Fração 11 da cromatografia de exclusão molecular Superose 12	0,6	400	$2,4 \times 10^2$	0,5	0,3	8×10^2

5 ^a: unidade arbitrária

5.2.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCO

Os *pools* GF1 e GF2 e as frações GF3 e GF4 foram cromatografados, separadamente, em coluna de fase reversa Supelco C-8, gerando 65 frações cada, das quais 13, 15, 8 e 6 frações, respectivamente, foram ativas contra SS12 e encaminhadas para cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil™ Peptide C18. Das amostras analisadas, as listadas abaixo apresentaram os melhores resultados de purificação, quais sejam: *pool* das frações B11 a B14 e fração B15 proveniente de GF1, *pools* C1 a C3 e C4 a C10 obtidas de GF2, *pool* B15 a C2 adquiridas de GF3 e *pool* C1 e C2 originada de GF4.

5.2.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SEPHASIL™ PEPTIDE

Para a cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil™ Peptide C18, foram empregadas os *pools* e as frações obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelco: FR1 (B11 a B14), FR2 (B15), FR3 (C1 a C3), FR4 (C4 a C10), FR5 (B15 a C2) e FR6 (C1 a C2). Cada corrida originou 65 frações e, dentre essas, algumas apresentaram atividade antagonista contra SS12. As frações ativas 33 a 40, 34 a 36, 33 a 40 - 57 e 58, 33 a 40 e 55 a 58, 35 a 40, 35 a 40 provenientes, respectivamente, de FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, foram eluídas com 61,3 a 80%, 64 a 69,3%, 61,3 a 80%, 61,3 a 80%, 66,6 a 80%, 66,6 a 80% de acetonitrila, com exceção das frações 57 e 58 de FR3 e 55 a 58 de FR4 que foram eluídas no reequilíbrio da coluna, figuras 3 a 8, e figuras 1 a 5 no Apêndice 1. A eluição com altas concentrações de acetonitrila é um indicativo do caráter hidrofóbico da molécula. A alta hidrofobicidade favorece a atividade antagonista e essa característica é observada entre peptídios e proteínas antimicrobianas (Bahar & Ren, 2013).

As frações ativas recuperadas do último passo cromatográfico foram analisadas por espectrometria de massas para verificar a pureza das mesmas.

5.2.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE AFINIDADE HEPARINA

C-75 foi cromatografado em coluna de afinidade heparina gerando 44 frações
5 ativas contra SS12. As frações 1 a 10, que não interagiram com a coluna e as frações
11 a 19, 20 a 25, 26 a 30, 31 a 36, 37 a 44 eluídas com 0 a 20%, 21 a 44%, 45 a 62%,
63 a 87% e 88 a 100% de NaCl foram agrupadas nos *pools* AF1, AF2, AF3, AF4, AF5 e
AF6, respectivamente. Respeitando o perfil cromatográfico e a ação antagonista, os
10 *pools* ativos dialisados foram liofilizados, ressuspendidos em água ultrapura
(200µl/fração) e encaminhados para a cromatografia de troca iônica em coluna Mono
Q.

5.2.6 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

15
Todos os *pools* obtidos da cromatografia em coluna de afinidade foram
cromatografados em coluna de troca iônica. No entanto, será ressaltado apenas os
pools AF3 e AF4, que apresentaram os melhores resultados de purificação. Os *pools*
20 AF3 e AF4, cromatografados em coluna de troca iônica Mono Q, geraram,
respectivamente, 33 e 28 frações ativas que foram dessalinizadas, concentradas,
purificadas com ponteiros Ziptips C-18 e encaminhadas para a análise por
espectrometria de massas.

5.2.7 SS12 EMPREGADA COMO MATRIZ DE AFINIDADE

25
A ação antagonista das amostras analisadas foi observada a partir do ponto 9 h
30 de incubação. O melhor resultado foi obtido no ponto 26 h, com título antagonista 6.400
UA/mL. Após o ensaio cromatográfico da amostra 26 h em coluna de fase reversa
Sephasil™ Peptide C18, foi realizado o teste de atividade antagonista. As frações 32 a
36, eluídas com 58,6 a 69,3% de acetonitrila, e a fração 58, eluída no reequilíbrio da

coluna (FIG. 6, Apêndice 1), foram ativas contra SS12 e analisadas por espectrometria de massas.

5

5.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SEQUENCIAMENTO

As frações ativas obtidas da cromatografia de fase reversa em coluna
10 Sephasil™ Peptide C18 foram analisadas por espectrometria de massas. A análise evidenciou a presença de amostras parcialmente purificadas e purificadas com massas moleculares de 7,2; 8,6; 9,2, 4,7/9,5 e 10,7 kDa, sendo os melhores resultados listados na TAB. 2 e FIG. 7 a 25 do Apêndice 1. Foram observadas, em algumas amostras, massas moleculares de 644,0; 666,0; 855,0; 929,1; 1060,0; e 1271,4 Da. No entanto,
15 essas massas não são referentes às substâncias que apresentam ação antagonista contra SS12, mas, sim, a sinais das matrizes utilizadas para a análise (Smirnov *et al.*, 2004).

As moléculas purificadas de 9.2 kDa, com 90 resíduos de aminoácidos, e 10.7 kDa, com 95 resíduos, apresentaram intensidade de sinal favorável e foram submetidas
20 a fragmentação e sequenciamento em espectrômetro de massa (FIG. 9 a 14). As sequências dos resíduos de aminoácidos identificadas foram analisadas no banco de dados *Genbank*, ferramenta *Protein BLAST*. A análise indicou, respectivamente, 54 e 19 aminoácidos idênticos com homologia elevada (identidade e *Query coverage* de 100%) para uma proteína ligadora de DNA (tipo histona) e uma proteína de hibernação
25 ribossômica, ambas de *S. sonnei* (TAB. 3).

Durante o desenvolvimento do meu mestrado (Moreira, 2014), a substância ativa com massa molecular 7,2 kDa foi purificada e parcialmente sequenciada. A análise do sequenciamento dos resíduos de aminoácidos identificou a substância como uma proteína ribossomal L29 de *E.coli*. Por se tratar das mesmas amostras produtora e
30 reveladora, o emprego dos mesmos métodos de purificação e com base na massa molecular, é plausível inferir que a substância atualmente purificada é a mesma anteriormente isolada.

Na busca por isolar e identificar biomoléculas ativas contra SS12, outras metodologias também foram utilizadas. Sendo assim, C-75 foi cromatografado em coluna de afinidade heparina, gerando 44 frações ativas e, dessas, os *pools* AF3 (frações 20 a 25) e AF4 (frações 26 a 30) foram cromatografados em coluna de troca iônica Mono Q. As frações ativas, tratadas com ponteira Ziptip C-18, foram analisadas por espectrometria de massas, que identificou a presença de frações purificadas e parcialmente purificadas com massas moleculares de 1,5; 8,1 e 8,6 kDa (TAB. 4) (FIG. 26 a 31 do Apêndice 1). A análise da sequência dos resíduos de aminoácidos das biomoléculas aqui citadas está sendo realizada para a identificação das substâncias.

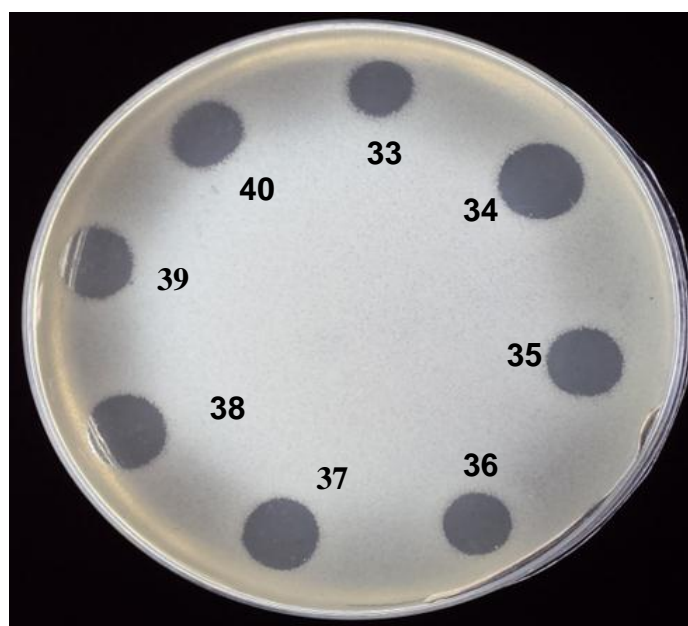
Outra metodologia utilizada para a busca de biomoléculas ativas foi a utilização da amostra reveladora SS12 como uma matriz ligante para substância antagonista. O ponto 26 h apresentou melhor resultado e foi cromatografado. As frações ativas 32 a 36 e 58 foram analisadas por espectrometria de massas e os melhores resultados foram obtidos nas frações 35 e 36, com 5 e 3 massas, respectivamente (TAB. 5 e FIG. 32 e 33 do Apêndice 1).

Durante os ensaios de purificação por cromatografia líquida, foram obtidas frações que não interagiram com a coluna de troca iônica Mono-Q, sugerindo caráter catiônico ou neutro da molécula. Essas mesmas amostras foram eluídas com concentrações elevadas de acetonitrila, sugerindo caráter hidrofóbico. Além dessas moléculas, outras ficaram retidas na coluna, sendo eluídas com 6 a 19% de sal, o que pode sugerir carga líquida negativa. Peptídios antimicrobianos, geralmente, são constituídos por 12 a 100 resíduos de aminoácidos, sendo, na maior parte das vezes, substâncias catiônicas e anfífilas (Bahar & Ren, 2013). Essa característica catiônica da molécula favorece o reconhecimento da célula alvo pelas interações eletrostáticas com o grupo fosfato do LPS e os fosfolipídios aniônicos da membrana externa, no caso de bactérias Gram negativas. Já o caráter hidrofóbico permite a interação do peptídio com a membrana citoplasmática e essa interação é peça fundamental na ação antagonista por atuação na membrana (Brogden, 2005). Embora não com frequência, peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs) já foram descritos na literatura. Esses compostos geralmente são ricos em glutamina e ácido aspártico, e, alguns deles, utilizam íons metais, como o zinco, para produzir uma ponte catiônica com as substâncias de carga negativa presente na membrana bacteriana. Assim, os AAMP

atravessam a membrana sem danificá-la, podendo atuar contra as organelas celulares, como os ribossomos (Gupta *et al.*, 2014; Jeżowska-Bojczuk & Stokowa-Softys, 2018).

- 5 Figura 3. Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

10



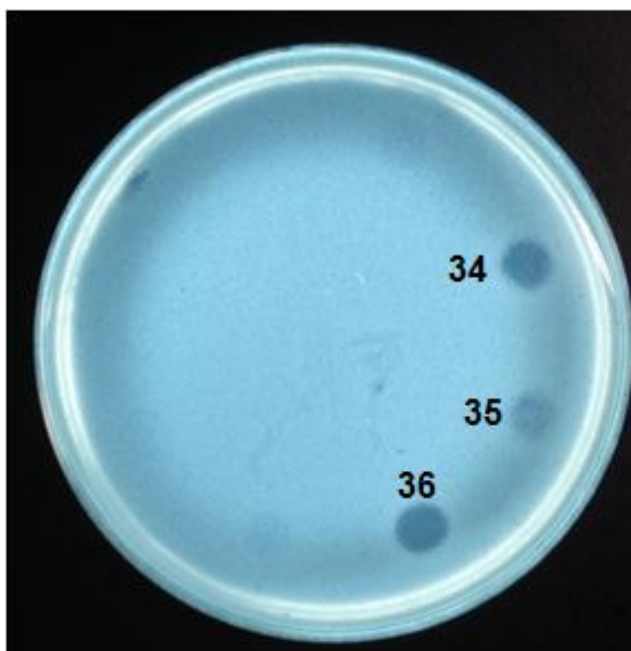
15

20

- 25 Halo de inibição produzido pelas frações 33 a 40 obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 [Origem: fração FR1 (frações B11 a B14) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool* GF1 (frações 2 a 6) da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]
- 30 contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

Figura 4. Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

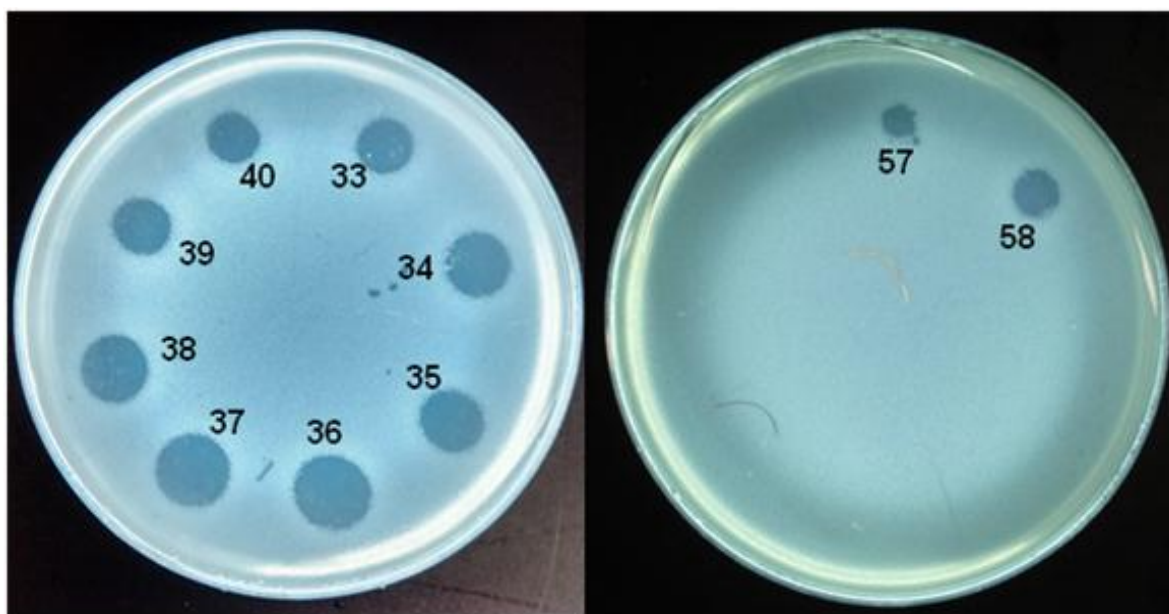
5



- 10 Halo de inibição produzido pelas frações 34 a 36 obtidas da cromatografia em coluna
de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 [Origem: fração FR2 (fração B15) da
cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool* GF1 (frações 2 a 6) da cromatografia
de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica -
15 extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]
contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

Figura 5. Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

5



10

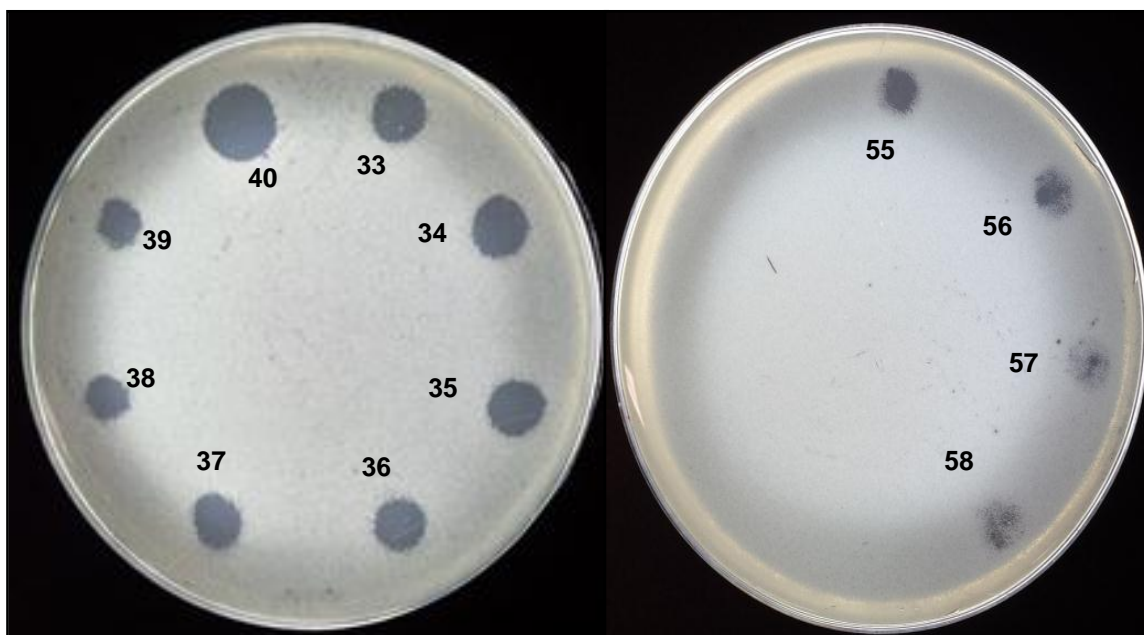
Halo de inibição proveniente das frações 33 a 40, 57 e 58 obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 [origem: fração FR3 (frações C1, C2 e C3) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/GF2 (frações 7 a 9) da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio] contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

20

Figura 6. Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

5

10



15

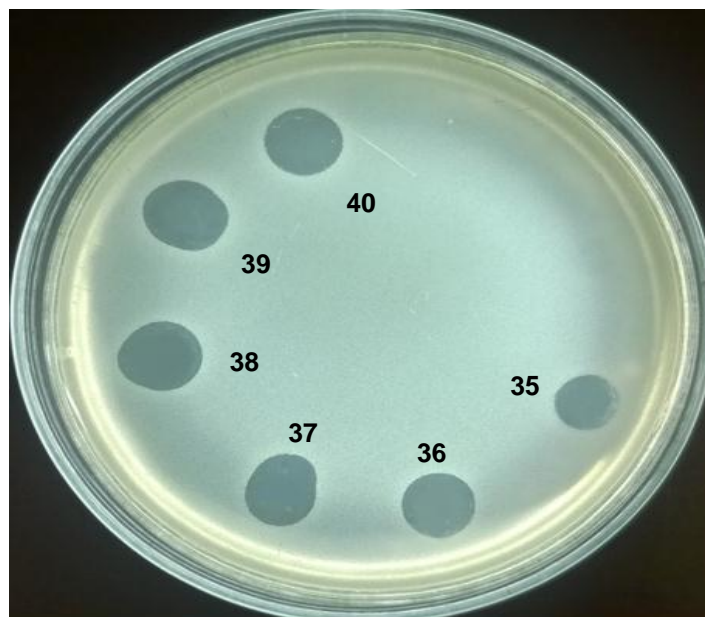
20

Halo de inibição proveniente das frações 33 a 40, 55 e 58 obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 [origem: fração FR4 (frações C4 a C10) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool* GF2 (frações 7 a 9) da cromatografia de exclusão molecular - *pool* T1 (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio] contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

25

Figura 7. Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

5



10

15

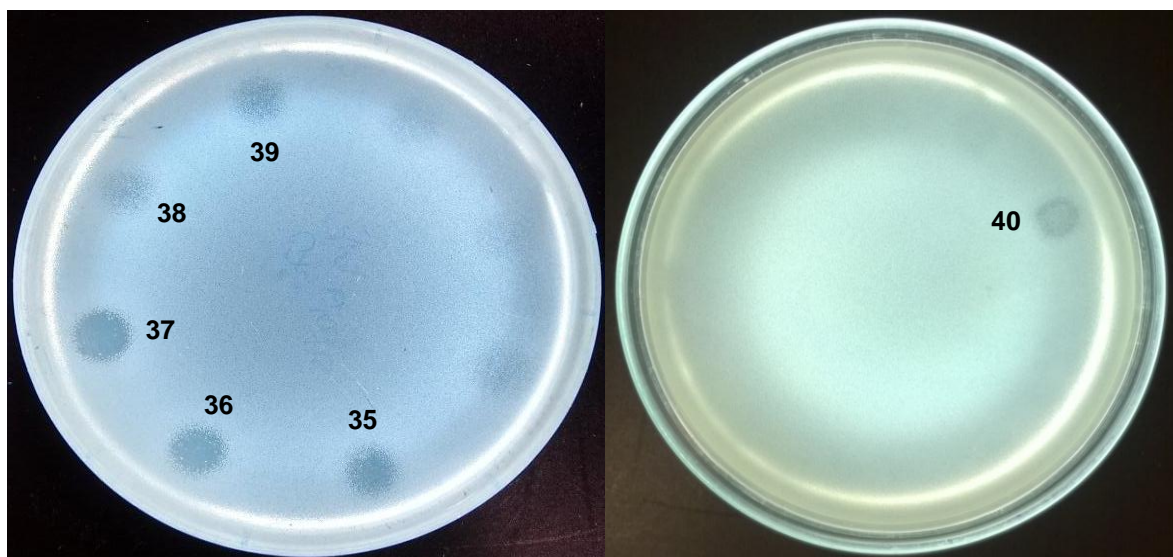
Halo de inibição proveniente das frações 35 a 40 obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 [origem: fração FR5 (frações B15 a C2) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool* GF3 (fração 10) da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio] contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

25

Figura 8. Atividade antagonista de frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

5

10



15

20

Halo de inibição proveniente das frações 35 a 40 obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 [origem: fração FR6 (frações C1 a C2) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool* GF4 (fração 11) da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio] contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

25

Tabela 2

Purificação por processos cromatográficos do extrato proteico intracelular precipitado a 75% de sulfato de amônio e análise por espectrometria de massas das frações purificadas e parcialmente purificadas.

5

Cromatografia					Massa molecular (Da)
Troca iônica	Exclusão molecular	Fase reversa			
Mono Q	Superose 12	Supelco C-8	Peptide C18	Eluição com acetonitrila (%)	
			FR7 (fração 37)	72%	9226,8 (DNA binding protein <i>S. sonnei</i>)
		Fração FR1 (fração B11 a B14)	FR8 (Fração 38)	74,6%	9230,0 (DNA binding protein <i>S. sonnei</i>)
			FR9 (fração 39)	77,3%	9220,4 (DNA binding protein <i>S. sonnei</i>)
<i>Pool</i> TI (frações 1 a 7)	<i>Pool</i> GF 1 (frações 2 a 6)		FR10 (fração 34)	64%	4763,2 (dupla carga ou dímero) 9526,2 (dupla carga ou dímero)
		Fração FR2 (fração B15)	FR 11 (fração 35)	66,6%	4606,3(dupla carga de 9215,9) 9215,9 (DNA binding protein <i>S. sonnei</i>)
					4604,2 (dupla carga de

Resultados e Discussão

		FR 12 (fração 36)	69,3%	9212,0) 9212,0 (DNA binding protein <i>S. sonnei</i>)
		FR 13 (fração 34)	64%	5369,1 (dupla carga de 10.741,6) 10.741,6 (Ribosome hibernation promoting factor of <i>S. sonnei</i>)
		FR 14 (fração 35)	66,6%	4607,1 (dupla carga de 9215,7) 5511,0 (dupla carga ou dímero) 7263,0 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29) 9215,7 (DNA binding protein <i>S. sonnei</i>) 11023,3 (dupla carga ou dímero)
<i>Pool GF 2</i> (frações 7 a 9)	<i>Pool FR3</i> (frações C1 a C3)	FR 15 (fração 37)	72%	7275,4 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29) 9119,2 10771,3 (Ribosome hibernation promoting factor of <i>S. sonnei</i>)
		FR16 (fração 38)	74,6%	7271,8 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29) 9119,8

Resultados e Discussão

			10749,7 (Ribosome hibernation promoting factor of <i>S. sonnei</i>)
	FR17 (fração 39)	77,3%	7275,4 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29)
	FR18 (fração 40)	80%	7274,9 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29)
	FR19 (fração 57)	reequilíbrio	7272,3 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29)
	FR20 (fração 58)	reequilíbrio	7298,5 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29)
	FR21 (Fração 34)	64%	7270,6 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29)
Pool FR4 (frações C4 a C10)	FR 22 (Fração 36)	69,3%	7263,6 (Ribosomal protein <i>Escherichia coli</i> L29)
	FR23 (Fração 37)	72%	4762,3 (dupla carga de 9524,4) 5373,7 7263,5 (Ribosomal

Resultados e Discussão

		protein <i>Escherichia coli</i>	
		L29)	
			9109,6
			9524,4
<hr/>			
		FR24 (fração 35)	4296,8 (dupla carga de 8594,8)
		66,6%	8594,8
<hr/>			
GF 4 (fração 11)	<i>Pool</i> FR6 (frações C1 e C2)		650,2
			713,3
		FR 25 (fração 37)	861,1 (matriz)
		72%	913,2
			1066,2 (matriz)
			1563,1

Tabela 3

Identificação por espectrometria de massas e banco de dados *Genbank* ferramenta *Protein BLAST* das substâncias antibacteriana purificadas

Espectrometria de massas								
Massa molecular (kDa)	Aminoácidos	Sequência de aminoácidos	Identificação da molécula	Identidade	Query Corerage	N° de acesso subject	N° de acesso pfam e cd query	Ponto isoelétrico
9,2	90	teslkegddvalvgftf raldaiiasvteslkegddvalvgftfavk mnksqlidkiaagadiskaaagraldaiia graldaiiasvteslkegd Rn	DNA-binding protein HU beta (<i>Shigella sonnei</i>)	100%	100%	WP_052978778	pfam00216	8,9
10,7	95	lrefvtakfakleqyfdri	Ribosome hibernation promoting factor (<i>Shigella sonnei</i>)	100%	100%	WP_052983145 .1	cd00552	6,3
Aminoácidos idênticos^a	DNA-binding protein HU beta (<i>Shigella sonnei</i>)	WP_052978778	MNKSQIDKIAAGADISKAAAGRALDIIASVTESLKEGDDVALVGFGTFVAVKERAARTGRNPQTGKEIPTPAKVPSFRAGK ALKDAVN					
	Ribosome hibernation promoting factor (<i>Shigella sonnei</i>)	WP_052983145.1	MQLNITGNNVEITEALREFVTAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKVIHTSDATLHVNGGEIHASAEGQDMYAAIDGLIDKLARQ LTKHKDKLKQH					

5 a; em vermelho, sequência de aminoácidos das proteínas purificadas idênticas as das proteínas depositas em banco de dados; pfam, *Protein Families Database*; cd, *Conserved Domains*.

Tabela 4

Purificação por processos cromatográficos do extrato proteico intracelular precipitado a 75% de sulfato de amônio e análise por espectrometria de massas das frações purificadas e parcialmente purificadas.

5

Cromatografia				
Afinidade		Troca iônica		Massa molecular (Da)
Heparina	% NaCl	Mono Q	% NaCl	
<i>Pool AF3</i> (frações 20 a 25)	21 a 44%	Fração 12	6%	8.609,3
		Fração 6	0%	1,496.7
		Fração 8	0%	961,4 1,496.6
		Fração 11	1%	8.098,2
<i>Pool AF 4</i> (frações 26 a 30)	45 a 62%	Fração 14	9%	4.061,2 (dupla carga de 8.119,6) 4.164,5 4.377,5 8.119,6
		Fração 18	19%	4049,7 7847,3 (dupla carga de 15.696,2) 15.696,2

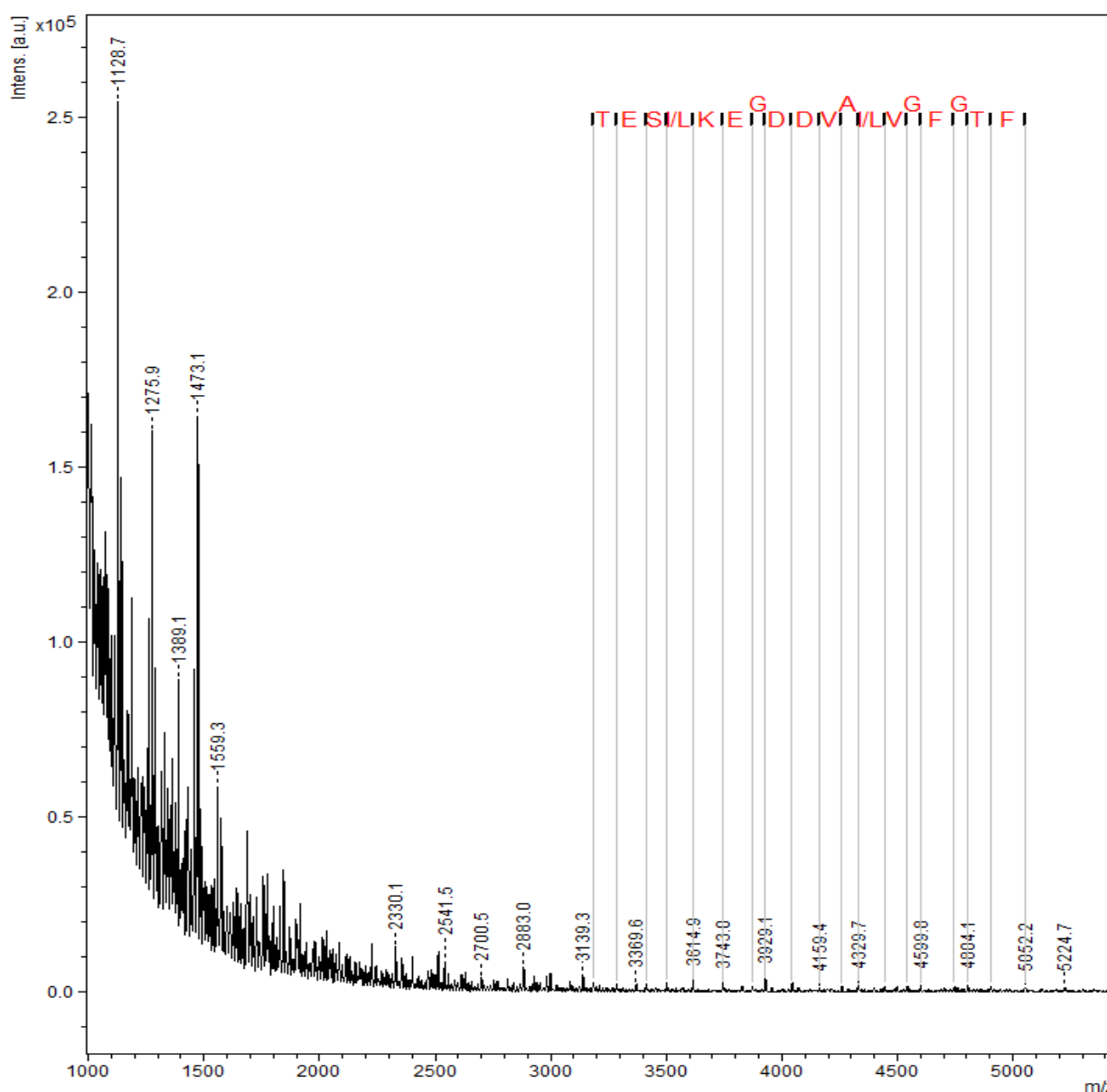
Tabela 5

Purificação parcial de substâncias antagonista utilizando SS12 como uma matriz de afinidade, cromatografia em coluna de fase reversa e análise por espectrometria de massas.

5

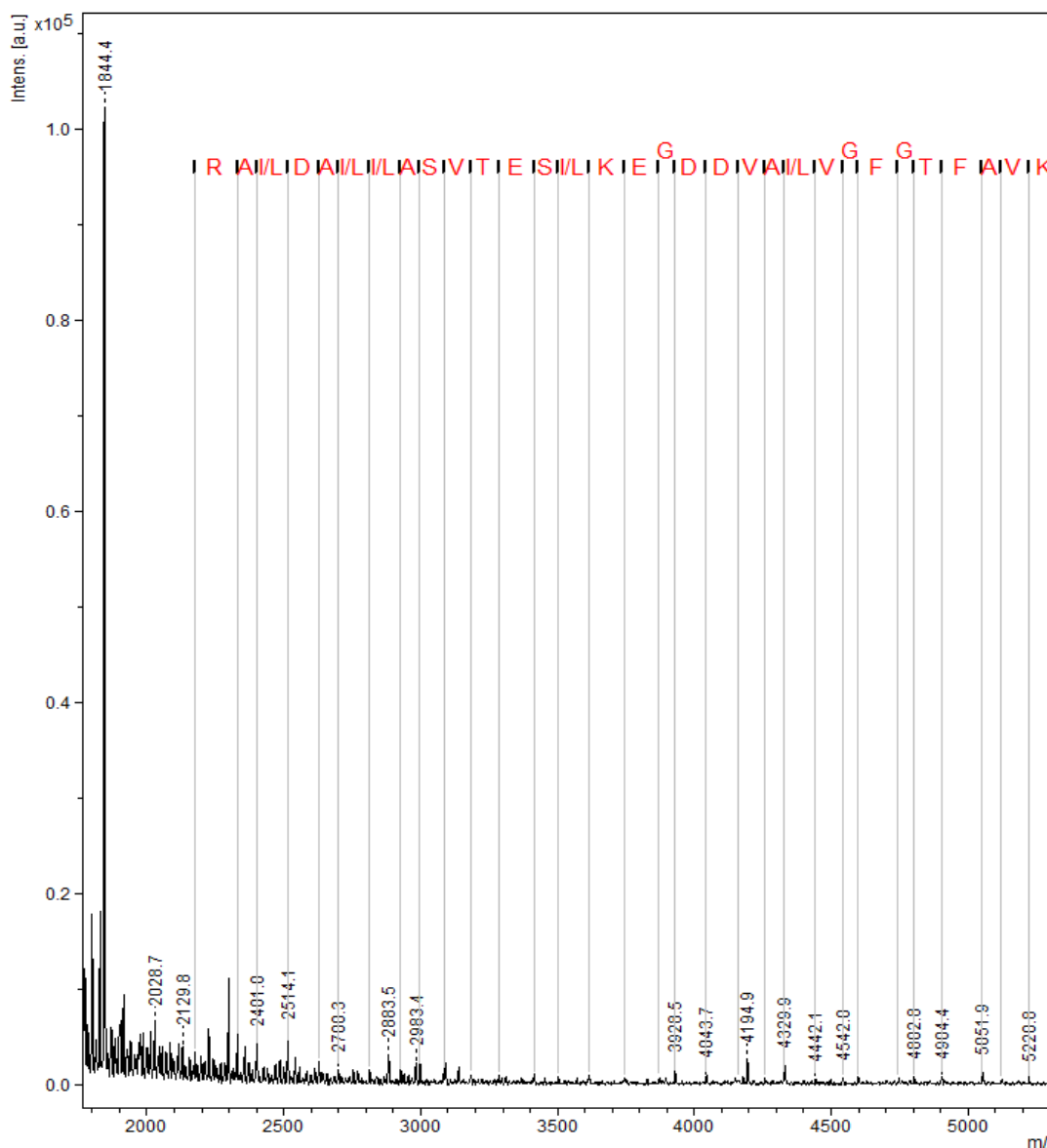
Purificação		Massa molecular (Da)
SS12 como matriz de afinidade	Cromatografia	
	Peptide C18	Eluição com acetoneireila (%)
		3493,7
		6611,6
	FR 32	66,6%
	(fração 35)	8065,3
		8816,1
		19937,2
		3495,7
	FR 33	69,3%
	(fração 36)	7095,8
		8135,6

Figura 9: Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*



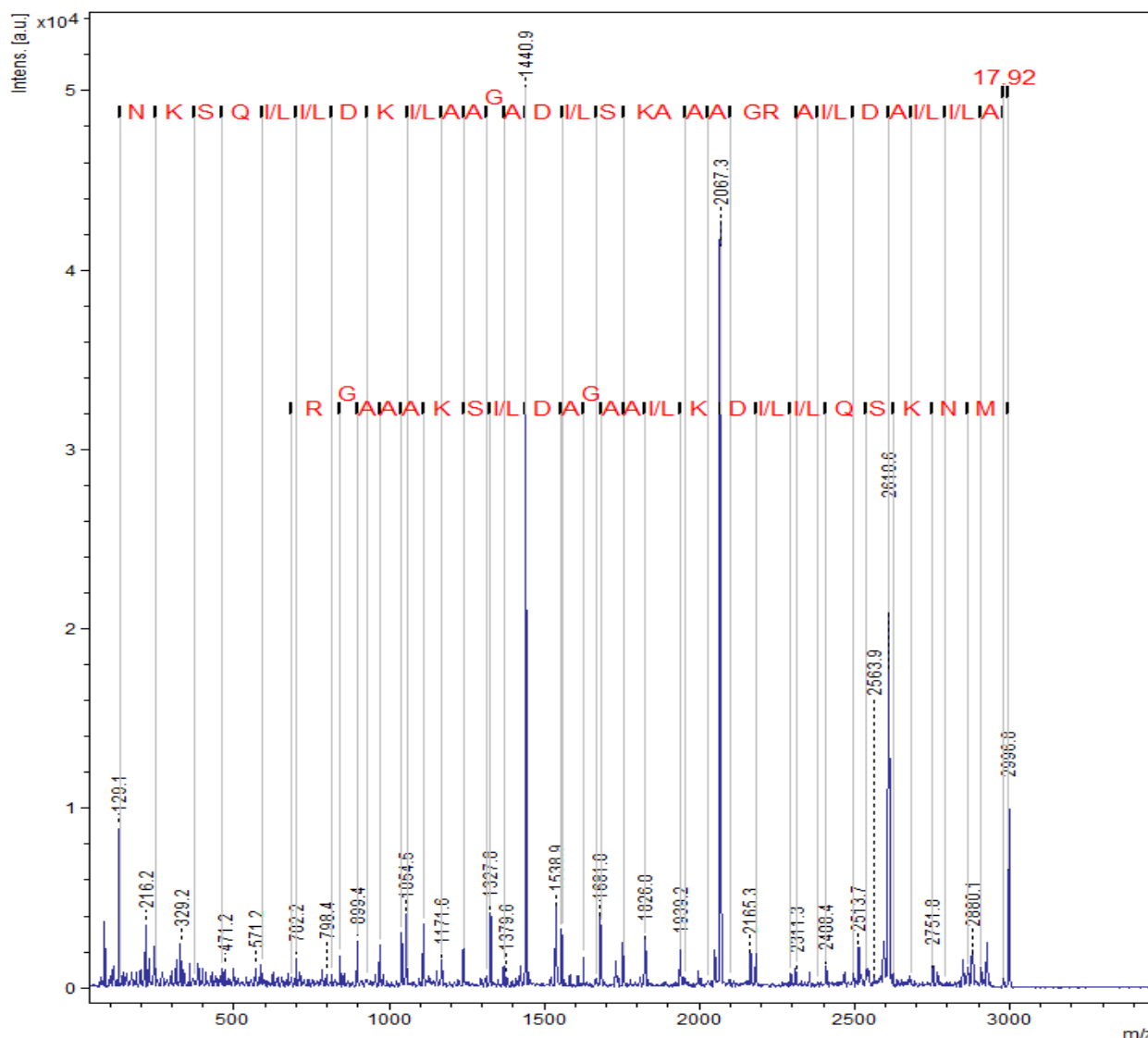
Fragmentação ISD em espectrofotômetro MALDI TOF TOF. Sequência obtida de 18
 5 resíduos de aminoácidos TESLKEGDDVALVGF que apresentou 100% de similaridade
 com a proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*. A proteína fragmentada possui massa
 molecular de 9.215,9 Da, e está presente na fração ativa purificada FR11 [Origem:
 FR11 (fração 35) da cromatografia de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 – FR2
 (fração B15) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 – *pool* GF1 (frações 2 a 6
 10 da cromatografia de exclusão molecular – *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de
 troca iônica) - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato
 de amônio]

Figura 10. Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*



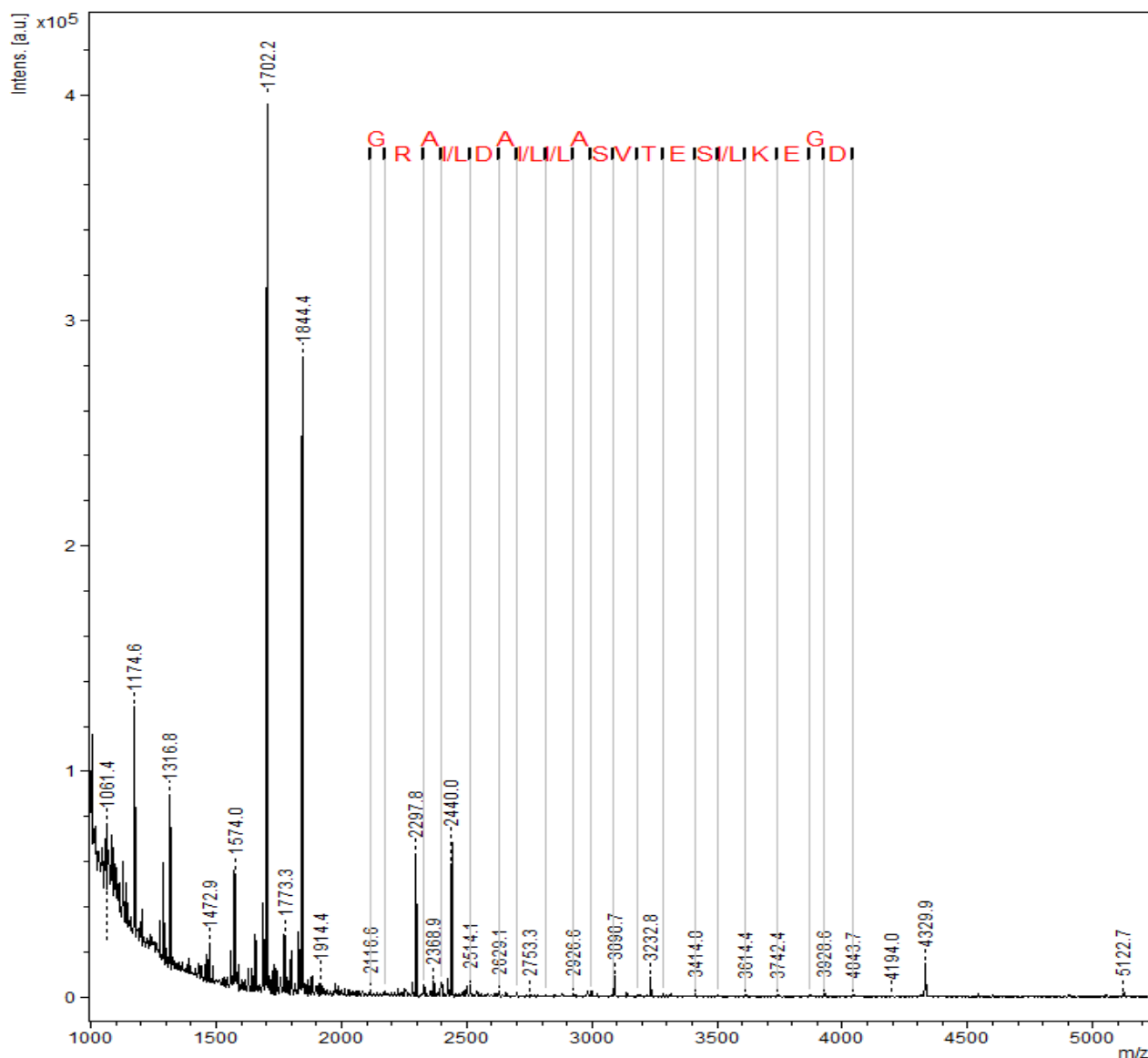
Fragmentação ISD em espectrofotômetro MALDI TOF TOF. Sequência obtida de 31
5 resíduos de aminoácidos RALDAIIASVITESLKEGDDVALVGF GTF AVIK que apresentou
100% de similaridade com a proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*. A proteína
fragmentada possui massa molecular de 9.215,9 Da, e está presente na fração ativa
purificada FR11 [Origem: FR11 (fração 35) da cromatografia de fase reversa
Sephasil™ Peptide C18 – FR2 (fração B15) da cromatografia de fase reversa Supelco
10 C-8 – pool/ GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular – pool/ TI
(frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) - extrato intracelular de *Shigella sonnei*
SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio].

Figura 11. Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*



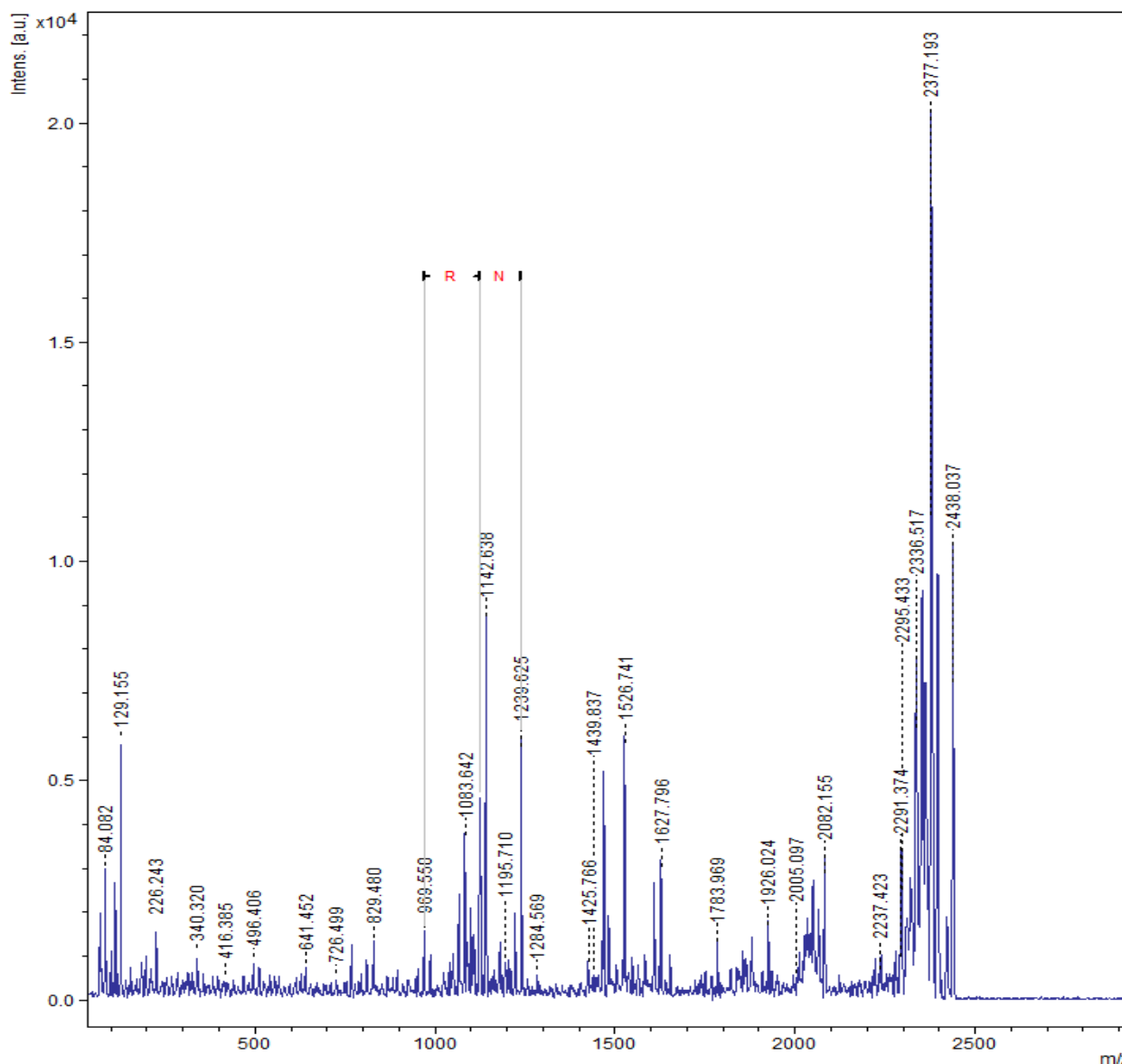
- 5 Fragmentação modo PSD (MS/MS) em espectrofotômetro MALDI TOF TOF. Sequência obtida de 30 resíduos de aminoácidos MNKSQLIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIA que apresentou 100% de similaridade com a proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*. A proteína fragmentada possui massa molecular de 9.212,0 Da, e está presente na fração ativa purificada FR12 [Origem: FR12 (fração 36) da cromatografia de fase
- 10 reversa Sephasil™ Peptide C18 - FR2 (fração B15) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/ GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/ TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio].

Figura 12. Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*



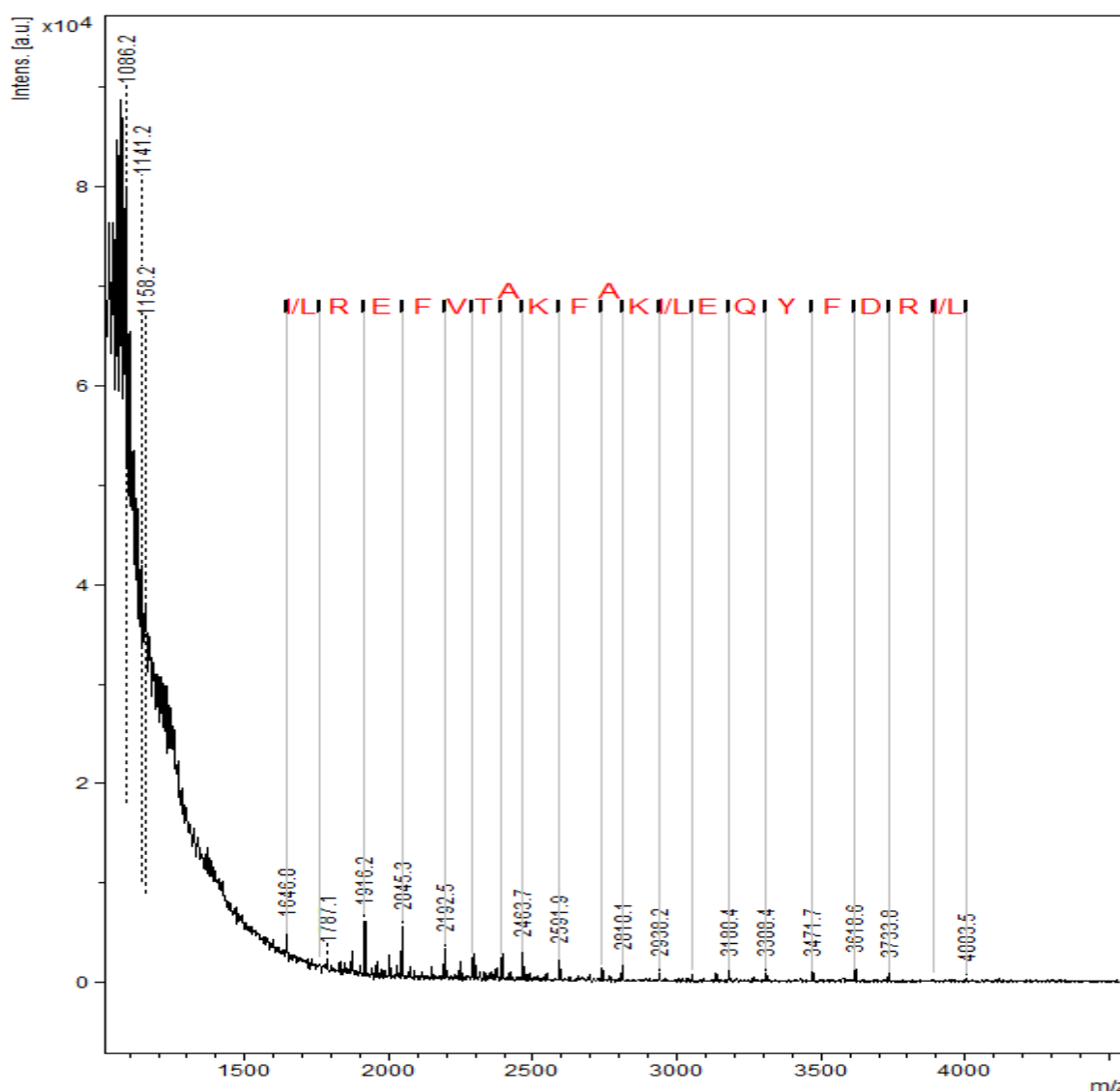
- 5 Fragmentação ISD em espectrofotômetro MALDI TOF TOF. Sequência obtida de 19 resíduos de aminoácidos GRALDAIIASVTESLKEGD que apresentou 100% de similaridade com a proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*. A proteína fragmentada possui massa molecular de 9.212,0 Da, e está presente na fração ativa purificada FR12 [Origem: FR12 (fração 36) da cromatografia de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 - FR2
- 10 (fração B15) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - pool GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio].

Figura 13. Perfil de fragmentação da proteína de ligação de DNA de *S. sonnei*



Fragmentação modo PSD (MS/MS) em espectrofotômetro MALDI TOF TOF. Sequência
 5 obtida de 2 resíduos de aminoácidos RN que apresentou similaridade com a proteína
 de ligação de DNA de *S. sonnei*. A proteína fragmentada possui massa molecular de
 9.212,0 Da, e está presente na fração ativa purificada FR12 [Origem: FR12 (fração 36)
 da cromatografia de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 - FR2 (fração B15) da
 cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - pool GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia
 10 de exclusão molecular - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) -
 extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio].

Figura 14. Perfil de fragmentação da proteína fator de promoção da hibernação ribossômica de *S. sonnei*



Fragmentação ISD em espectrofotômetro MALDI TOF TOF. Sequência obtida de 19
 5 resíduos de aminoácidos LREFVTA K FAKLEQYFDRI que apresentou 100% de
 similaridade com a proteína fator de promoção da hibernação ribossômica de *S. sonnei*
 com massa molecular de 10.741,6 Da, presente na fração ativa purificada FR13.
 [Origem; FR 13 (fração 34) da cromatografia de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 -
pool/ FR3 (frações C1 a C3) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool* GF2
 10 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/ TI (frações 1 a 7 da
 cromatografia de troca iônica) - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a
 75% de sulfato de amônio].

Dentre as substâncias em estudo, foram purificadas sete biomoléculas com ação antagonista contra SS12, das quais, duas, com massa molecular de 9,2 e 10,7 kDa, foram identificadas, no presente trabalho, respectivamente, como proteína ligadora de DNA, que é comumente conhecida como proteína tipo histona, devido à similaridade no papel fisiológico com as histonas de eucariotos e proteínas fator de promoção da hibernação ribossômica, que auxiliam na supressão da tradução no momento de estresse celular (Grove, 2011; McKay & Portnoy, 2015). Outra proteína purificada, com massa molecular de 7,2 kDa, foi identificada, anteriormente, como uma proteína ribossomal L29 de *E. coli*, substância constituinte dos ribossomos, responsável pela síntese proteica. Já as massas moleculares de 4,7 e 9,5 kDa são referentes a dupla carga ou dímero de uma mesma substância, mas devido à baixa intensidade de sinal da amostra, quando analisada por espectrometria de massas, a massa molecular e a identificação da biomolécula não foi determinada, e ainda, aquelas substâncias com massas moleculares de 1,5; 8,1 e 8,6 kDa serão analisadas por sequenciamento e comparação em banco de dados.

A síntese de substâncias proteicas com funções clássicas que também desempenham ação antagonista são relatadas na literatura, como a produção de quatro proteínas ribossomais, um peptídeo fator de iniciação da tradução e uma proteína não caracterizada que foram isoladas de uma amostra de *L. sakei* subsp. *sakei* 2a. As substâncias apresentaram ação antagonista contra *L. monocytogenes* por proporcionar o aumento do efluxo de ATP e reduz o potencial de membrana, sendo consideradas, após estudos preliminares, como boas candidatas no controle de *L. monocytogenes* em alimentos (Carvalho *et al.*, 2018). Outras substâncias também foram isoladas de *L. sakei* subsp. *sakei* 2a, como uma proteína tipo histona, uma proteína ribossomal e uma bacteriocina formadora de poros, denominada sacaricina P. As substâncias foram ativas contra *L. monocytogenes* e *E. faecalis* (Carvalho *et al.*, 2010). Um fragmento de histona, isolado do tecido gástrico de sapo (*Bufo bufo garagrizans*), também foi caracterizado como promotor da ação antagonista por ser capaz de atravessar a membrana citoplasmática e se ligar fortemente aos ácidos nucleicos da bactéria sensível (Park *et al.*, 2000). Outros resultados foram relatados por Lee *et al.* (2002), que observaram na porção N terminal da proteína ribossomal L1 de *H. pylori*, ação antagonista contra *Bacillus subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Saccharomyces*

5 *cerevisiae*. A ação antagonista também foi observada em um derivado da hemoglobina de peixe, denominado Sh β AP, que foi ativo contra as bactérias Gram positivas *B. subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus* sp. e as bactérias Gram negativas, *E. coli* D31, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus* e também *S. sonnei* (Seo et al., 2014).

10 Ainda que já tenha sido relatada, para os mais diversos organismos, a síntese de proteínas ribossomais e proteínas tipo histonas, ou fragmentos dessas substâncias, que exercem, além das funções clássicas, a ação antagonista contra microrganismos, resultados semelhantes não foram encontrados para aquelas produzidas por membros do gênero *Shigella*. E, até então, a proteína fator de promoção da hibernação ribossômica também não foi encontrada como promotora da ação antagonista contra microrganismos.

15

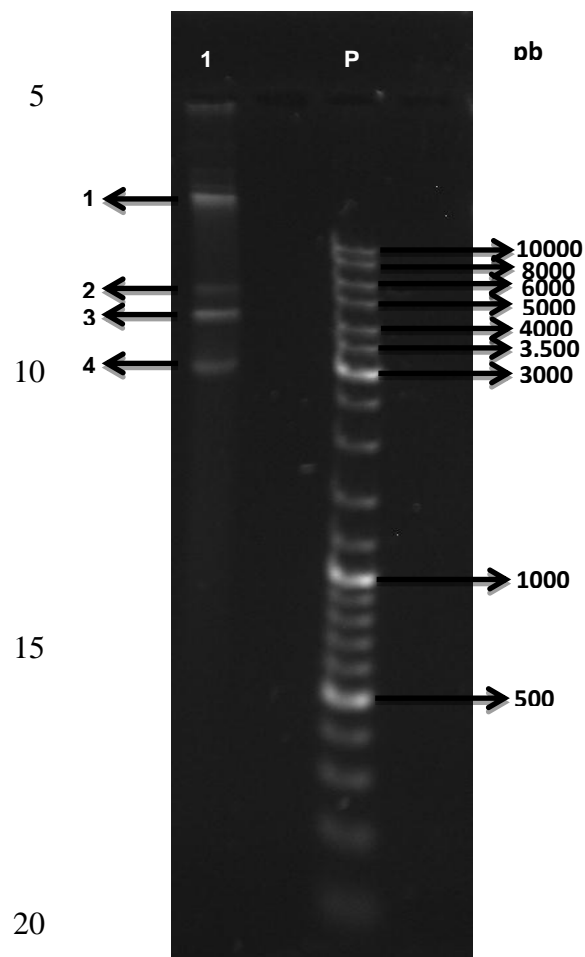
5.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO DNA EXTRACROMOSSÔMICO DE *S. sonnei*

20 **5.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA**

25 O perfil das bandas do DNA extracromossômico de *S. sonnei* e o padrão de massa molecular podem ser visualizados em gel de agarose 0,7% (p/v), corado com GelRed™ (FIG 15). A análise da amostra evidenciou a presença de quatro bandas. Uma com massa molecular superior a 10kDa, e as demais com massa molecular inferior a 6, 5, e, aproximadamente, 3 kDa, que foram identificadas, respectivamente, como 1, 2, 3 e 4.

30

Figura 15. Perfil do DNA extracromossômico de *S. sonnei* produtora de substância antagonista.



1, perfil do DNA extracromossômico de *S. sonnei* SS9 obtido após extração empregando o kit comercial *Geneaid™ Plasmid Maxi (Endotoxin Free)*; P, padrão de massa molecular (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3*).

5.4.2 SEQUENCIAMENTO DO DNA EXTRACROMOSSÔMICO ISOLADO DE *S.SONNEI* SS9

A análise em equipamento *Illumina* versão *Miseq* do DNA extracromossômico extraído da amostra produtora de substância antagonista SS9 originou 64.694 *reads* com comprimento de 301 pb/cada, o que representa 38.945.788 pares de bases sequenciadas com cobertura de sequenciamento de 653 vezes. A análise por sobreposição das *reads* resultou na montagem final de 4 contigs de massas moleculares 46.188, 6.134, 5.230 e 2.076 pb.

5.4.3 ANOTAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DOS CONTIGS

Os quatro *contigs* obtidos tiveram suas ORFs analisadas em bancos de dados.

5 O primeiro *contig*, 46.188pb, apresentou identidade de 99% e *Query coverage* de 98%, demonstrando alta homologia, com o plasmídio p634-1 isolado de *E. coli* (número de acesso *Genbank* MG692624.1). A análise individual das 58 ORFs obtidas identificou 18 proteínas hipotéticas ou não caracterizadas e 30 proteínas relacionadas a fago, sendo algumas associadas ao bacteriófago lambda (TAB. 1, Apêndice 2). A presença dos
10 genes que codificam a produção de bacteriófagos demonstram que SS9 alberga o vírus.

A análise em banco de dados do segundo *contig*, 6.134 pb, demonstrou homologia elevada (identidade de 99% e *Query coverage* de 97%) com o plasmídio pMRY16-002_5 isolado de *E. coli* (número de acesso no *Genbank* AP017615.1) e
15 com o plasmídio pSSE3 obtido de *S. sonnei* (identidade de 97% e *Query coverage* de 85%) (número de acesso no *Genbank* KP970685.1). A análise individual das 7 ORFs que compõe o *contig* 2 também apresentaram alta homologia com proteínas depositadas no banco de dados. Das 7 ORFs encontradas, 2 foram identificadas como proteínas hipotéticas (*E. coli*), 1 como proteína de replicação de plasmídio - Rep (*S. sonnei*), que possui a função de se ligar a região OriT e iniciar a replicação do
20 plasmídio; 1 proteína de mobilização (*S. sonnei*), que participa do processo de transferência do plasmídio para uma célula receptora; 1 proteína de lise E8 (*Enterobacteriaceae*), que é responsável por liberar a colicina produzida para o meio extracelular; 1 proteína de imunidade (*S. sonnei*), que protege a célula produtora contra
25 colicina e 1 colicina (*S. sonnei*), que possui ação antagonista contra outras bactérias (FIG. 34 e TAB. 2, Apêndices 1 e 2) (Meyer, 2000; Yagura & Itoh, 2006; Cascales, 2007; Calcuttawala *et al.*, 2017).

A análise genética do óperon para colicina presente no *contig* 2, denominado plasmídio 2, demonstrou homologia de 100% entre a proteína de lise estudada no
30 presente trabalho e a proteína de lise E8. Os demais genes que compõem o óperon das colicinas, genes para a proteína de imunidade e colicina, não foram homólogos com os genes do óperon E8. No entanto, ambas as proteínas de imunidade e colicina de SS9 apresentaram homologia de 100% com uma proteína de imunidade e uma

colicina que ainda não foram nomeadas. Com base na sequência de aminoácidos da colicina aqui estudada, é possível inferir que a proteína possui 575 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 61,2 kDa. A presença dos genes *rep* e *mob* aqui observados também foi relatada em plasmídios colicinogênicos, como aqueles do tipo E (Col E1-E9). Esses plasmídios são pertencentes ao grupo de plasmídios do tipo I, que apresentam tamanho de 6 a 10 kDa e, geralmente, estão presentes em um número de 20 cópias por células (Cascales, 2007; Calcuttawala *et al.*, 2017).

Como observado, a colicina aqui estudada não foi nomeada dentro do grupo das colicinas. Essa nomenclatura é atribuída à substância com base no receptor celular que a molécula tem afinidade e nas letras do alfabeto, destinada para cada receptor. Assim, quando mais de uma colicina se liga ao mesmo receptor elas são nomeadas pela letra atribuída ao receptor seguida de um número. Como no caso, as nove colicinas do grupo E se ligam ao receptor BtuB e são nomeadas como colicinas E1 a E9 (Cascales, 2007).

O terceiro *contig*, 5.230 pb, contém 6 ORFs e homologia elevada (identidade de 99% e *Query coverage* de 100%) com o plasmídio colicinogênico E1, pSS046_spB de *S. sonnei* (número de acesso *Genbank* CP000642.1). A avaliação genética/proteica de cada ORF pode ser observada na FIG. 35 e TAB. 3, Apêndices 1 e 2. A ORF1 codifica a síntese da proteína Rop, responsável por controlar o número de cópias de plasmídios colicinogênicos, como observado para a colicina E1; a ORF2 codifica a síntese da proteína de lise para colicina (*Enterobacteriaceae*); a ORF3 sintetiza a colicina E1; a ORF 4 e a ORF 5 sintetizam, respectivamente, as proteínas de exclusão de entrada 1 e 2, que atuam na estabilidade do plasmídio no interior da célula, e a ORF 6 codifica a proteína de mobilização de plasmídio.

Com base na análise dos dados, *S. sonnei* SS9 alberga o plasmídio colicinogênico pColE1. A presença de plasmídio codificador da colicina E1 também foi relatada em outras amostras da mesma espécie (Sansone *et al.*, 1981). Essa colicina possui massa molecular de 57,2 kDa. Quando em contato com a célula alvo, ela interage com o receptor para vitamina B12 (BtuB), transloca a parede celular através do sistema Tol e atua pela formação de poros na membrana citoplasmática. O óperon que codifica os genes para as colicinas formadoras de poros podem não albergar o gene para a proteína de imunidade, uma vez que a colicina não interage com a

membrana, quando ela se encontra no meio intracelular (Yamada, 1982; Cascales, 2007; Rebuffat, 2011a; Zamaroczy & Chauleau, 2011; Jakes, 2017)

O quarto contig, 2.076 pb, apresenta 3 ORFs, sendo a segunda responsável pela resistência a antimicrobianos, em especial a trimetoprima (TAB. 4, Apêndice 2).

5

5.5. BUSCA POR COLICINAS SINTETIZADAS POR *S. sonnei*

10

5.5.1 SDS-PAGE

O perfil eletroforético do extrato C30 em gel de poliacrilamida 12,5% corado por prata pode ser observado na FIG. 16. A estimativa das bandas proteicas em programa KODAK *Gel Logic Imaging System* evidenciou a presença de duas bandas nos valores de 61,6 e 57,4 kDa.

20 5.5.2 GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO *IN SITU*

A análise do extrato intracelular C30 em gel de poliacrilamida 12,5% revelado *in situ* evidenciou a presença de duas linhas de inibição de SS12. Por comparação com o padrão de massa molecular, as linhas de inibição estão situadas entre 50 e 75 kDa (FIG 17). As demais amostras proteicas analisadas não apresentaram linha de inibição da amostra reveladora.

Com base nos valores das massas moleculares identificadas no gel de poliacrilamida corado por prata, nas duas linhas de inibição da amostra reveladora observadas no gel revelado *in situ* e nos valores das massas moleculares das colicinas codificadas pelos plasmídios 2 e 3, é possível sugerir que as bandas proteicas observadas nos géis revelados por prata e *in situ* são referentes à colicina codificada pelo plasmídio 2, com massa molecular de 61,2 kDa, que ainda não foi classificada

dentro do grupo das colicinas, e a colicina E1, com massa molecular de 57,2 kDa, codificada pelo plasmídio 3. Caso essa hipótese seja verdadeira, as colicinas estudadas apresentam ação antagonista contra SS12.

5

Figura 16. Gel de poliacrilamida corado por prata.

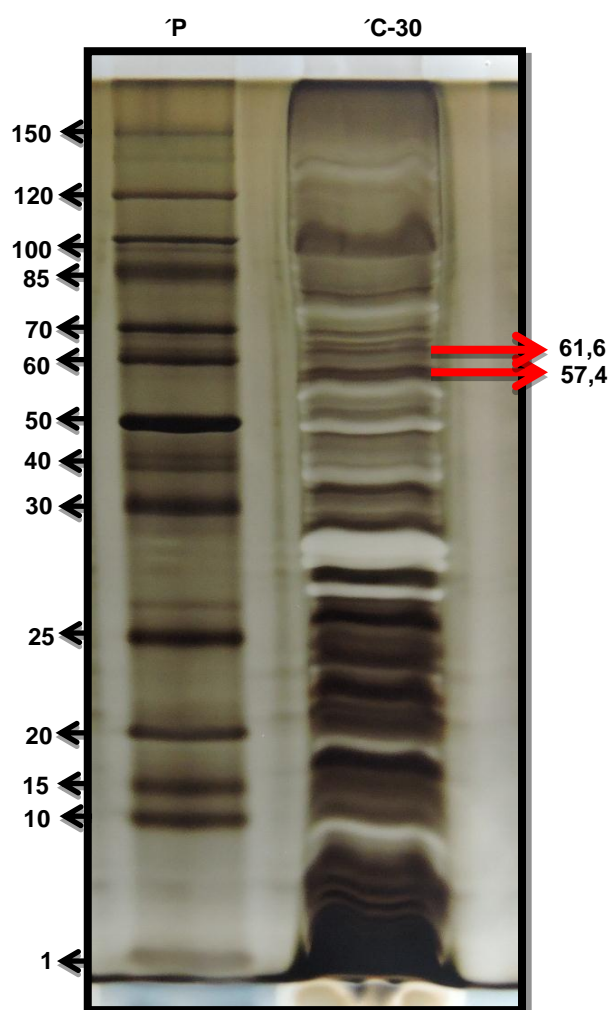
10

15

20

25

30



Gel de poliacrilamida 12,5% corado por prata. C-30, extrato proteico intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio; P, padrão de massa molecular *Protein Ladder* (#SM0661). Massas moleculares das bandas proteicas do extrato C-30 estimadas através do programa *KODAK Gel Logic Imaging System*

Figura 17. Gel de poliacrilamida revelado *in situ*.

5

10

15

20

25



30

Gel de poliacrilamida 12,5% revelado *in situ* com meio de cultura TSA semissólido acrescido da amostra reveladora SS12. P, padrão de massa molecular pré-corado *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (#1610374); 1 a 9, amostras proteicas; C30, extrato intracelular de *S. sonnei* produtora de substância antagonista precipitado com 30 %p/v de sulfato de amônio.

5.6 CONJUGAÇÃO E ANÁLISES DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

5.6.1 ESCOLHA DA AMOSTRA RECEPTORA

5

Com base no ensaio de difusão em sobrecamada, para a avaliação da ação antagonista, *E. coli* ATCC 25922 foi escolhida como receptora para o teste de conjugação. A amostra não foi ativa contra *S. sonnei* SS9 e *S. sonnei* SS12 e também não foi inibida por *S. sonnei* SS9 (TAB. 6). A escolha da amostra receptora é um passo importante para a pesquisa de plasmídeo conjugativo que possa codificar a produção de substância(s) antagonista(s), em especial bacteriocinas.

15

Tabela 6

Avaliação da atividade antagonista e da suscetibilidade celular frente à substância antagonista para a seleção de uma amostra receptora para o teste de conjugação.

Produtora de substância antagonista	Reveladora da expressão de antagonismo				
	<i>S. sonnei</i> SS9 ^b	<i>S. sonnei</i> SS12	<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	<i>E. coli</i> K12 Row	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>E. coli</i> K12 Row ^a	- ^c	-	NT	NT	NT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	NT	NT	NT
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	-	+++ ^e	NT	NT	NT
<i>S. sonnei</i> SS9	NT ^f	+++	+ ^d	+++	-

^a, amostras avaliadas como produtoras de substância antagonista; ^b, amostras testadas como reveladoras da expressão de antagonismo; ^c, ausência de atividade antagonista; ^d, halo de inibição pequeno e nublado; ^e, halo de inibição grande e límpido; ^f, não testado.

20

5.6.2 ANTIBIOGRAMA

5 A análise fenotípica, por antibiograma, evidenciou a resistência de *S. sonnei* SS9 aos antimicrobianos trimetoprima e ampicilina, enquanto que *E. coli* ATCC 25922 foi suscetível aos mesmos. O dado obtido para SS9 corrobora a análise genotípica por sequenciamento de plasmídios, que evidenciou a presença de um plasmídio de resistência, em especial à trimetoprima.

10 Segundo o CLSI (2003), alguns meios de cultura, como o TSA, contém inibidores de trimetoprima, um dos motivos pelos quais é preconizado o uso do meio Muller Hinton para o antibiograma. Durante todo o desenvolvimento do trabalho, foi utilizado meio TSA para a pesquisa de atividade antagonista e o mesmo não interfere na ação da ampicilina, sendo esta a droga de escolha para o prosseguimento dos ensaios de conjugação e transformação.

15

5.6.3 CONJUGAÇÃO

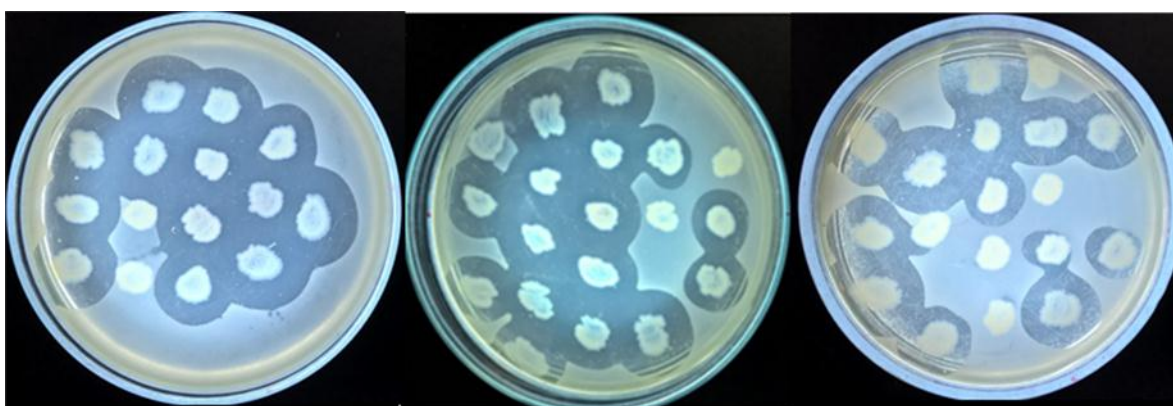
20 No ensaio, apenas as colônias de *E. coli*, que são lactose positivas, foram consideradas. A conjugação entre *S. sonnei* SS9 e *E. coli* ATCC 25922 com transferência do plasmídio que codifica resistência a ampicilina foi observada a partir de 15 min. Watanabe & Fukasawa (1960) também relataram a transferência de resistência a antimicrobiano no mesmo período de tempo. Resultados semelhantes
25 também foram reportados por Yah (2010), que observou a transferência de plasmídio conjugativo que codificava resistência antimicrobiana, inclusive à ampicilina, entre amostras de *Shigella* e *E. coli*. No meio sem antimicrobiano, o número de colônias lac⁺ e lac⁻ foi incontável, o que inviabilizou o emprego deste ensaio.

5.6.4 ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS CÉLULAS TRANSCONJUGANTES

5 O ensaio para avaliação de expressão de antagonismo pelas amostras de *E. coli* ATCC 25922 recuperadas do meio com ampicilina apresentou resultado positivo para algumas amostras (FIG. 18). O dado sugere a transferência horizontal, por conjugação, dos plasmídios que conferem as características fenotípicas de resistência à ampicilina e atividade antagonista contra SS12.

10

Figura 18. Atividade antagonista de amostras transconjugantes.



15

Halos de inibição produzidos pelas amostras transconjugantes de *E. coli* ATCC 25922 recuperadas de meio com ampicilina, contra a amostra reveladora SS12.

20 **5.6.5 ELETROFORESE**

O perfil do DNA extracromossômico de algumas das amostras em estudo está mostrado na FIG. 19. As demais corridas eletroforéticas apresentaram resultado semelhante. A amostra produtora apresentou quatro bandas distintas, como também foi observado no experimento de sequenciamento do DNA extracromossômico (5.4). A

25

amostra receptora apresentou perfil díspar da amostra produtora, exibindo bandas com massas moleculares superior a 10.000 pb e com cerca de 2.500 pb e 1.500 pb, respectivamente. As bandas 1, 2 e 3 foram observadas em todas as amostras transconjugantes, enquanto a banda 4 foi visualizada apenas em algumas amostras.

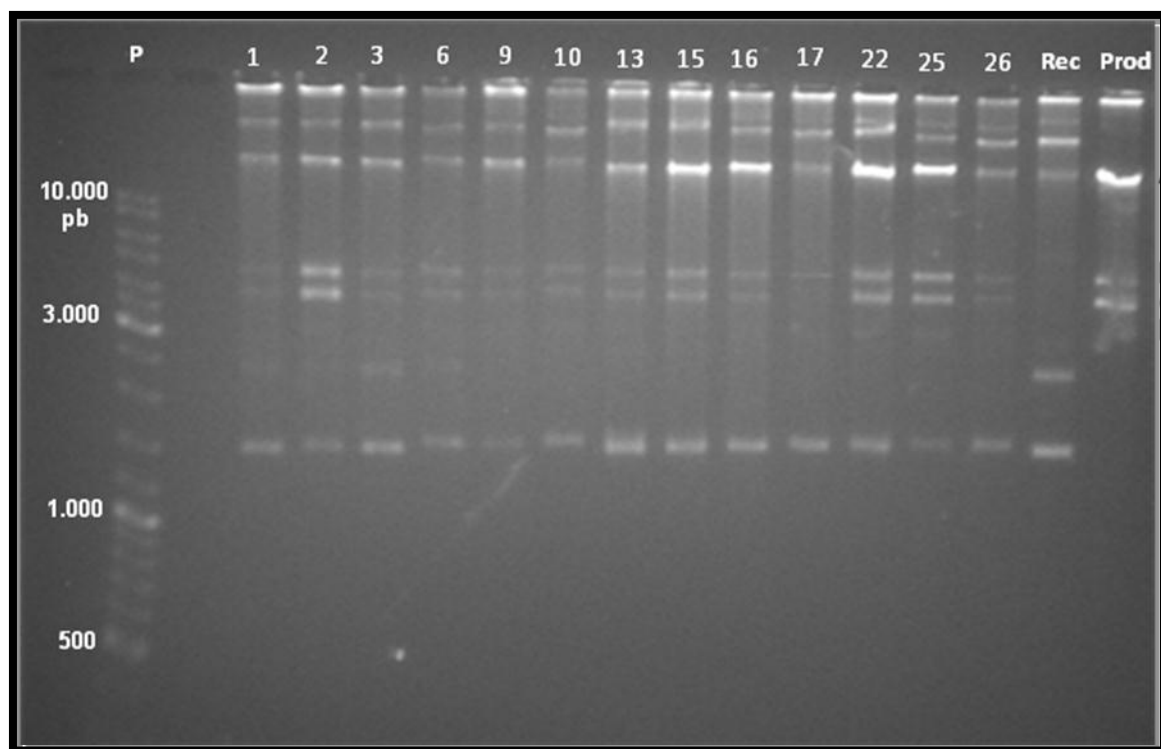
5 O perfil eletroforético comprova a eficiência da transferência por conjugação dos plasmídios colicinogênicos e de resistência ao antimicrobiano. A presença das bandas 2 e 3 em todas as amostras transconjugantes evidencia a necessidade do emprego de outra técnica para a separação dos plasmídios colicinogênicos. Embora a resistência a ampicilina tenha sido observada em todas as amostras transconjugantes
10 selecionadas, a visualização da banda 4 foi restrita a algumas amostras, o que não descarta a presença da mesma.

Figura 19. Perfil plasmidial das amostras produtora, reveladora e transconjugantes.

15

20

25



30

P, padrão de massa molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM0331/2/3); 1 a 26, amostras transconjugantes; Rec, amostra receptora, *E. coli* ATCC 25922; Prod, amostra produtora, *S. sonnei* SS9.

5.6.6 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA DE UMA AMOSTRA TRANSCONJUGANTE

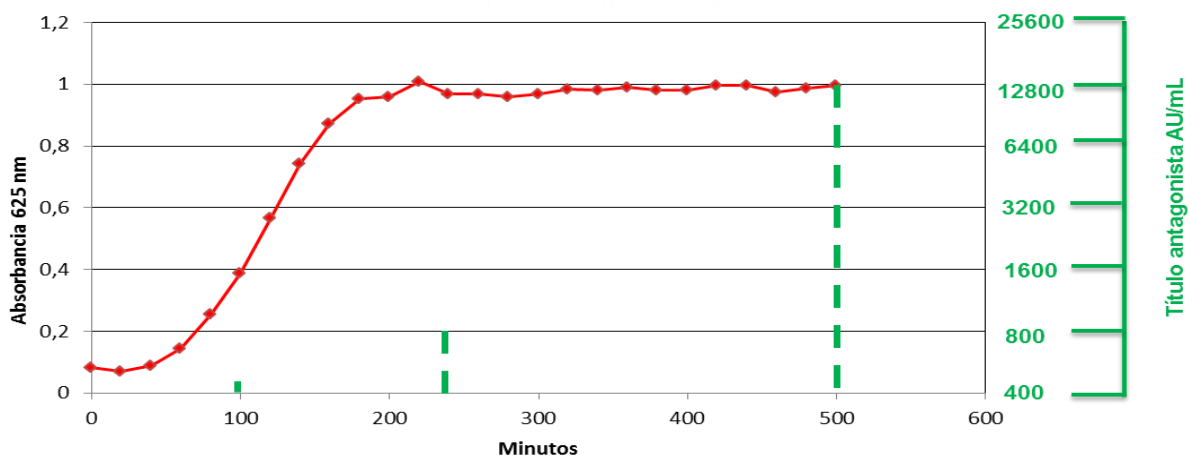
5 A amostra transconjugante 9, avaliada em relação a curva de crescimento bacteriano e a produção de substâncias antagonistas, apresentou início das fases exponencial e estacionária aos 60 e 180 min, respectivamente. A presença no meio extracelular da(s) substância(s) antagonista(s) iniciou, durante a fase exponencial, a 1h 40 min, com título 400 UA/mL com presença de halos de inibição pouco nítidos. Às 4 h 10 o título antagonista foi de 800 UA/mL com halos ainda pouco nítidos. O melhor resultado da ação inibitória foi observado durante a fase estacionária, a partir das 8h 20 min, com 400 UA/mL em halos límpidos e 12.800 UA/mL com halos menos nítidos (FIG. 20 e 21).

15 Habitualmente, o óperon que codifica a síntese de colicinas contém dois ou três genes que estão localizados em plasmídios colicinogênicos. A produção dessas substâncias é observada, em níveis basais, durante o início do crescimento bacteriano, e isso se deve à presença do repressor transcricional LexA, que permite a síntese das moléculas apenas em pequenas quantidades. Com o aumento da densidade populacional, a escassez de nutrientes ou a presença de substâncias nocivas ao DNA, 20 há uma elevação na síntese dessas moléculas, uma vez que o sistema SOS é ativado e leva à expressão de RecA, que se liga à LexA, permitindo a produção da colicina em maior quantidade (Cascales, 2007; Bakkal *et al.*, 2012).

25

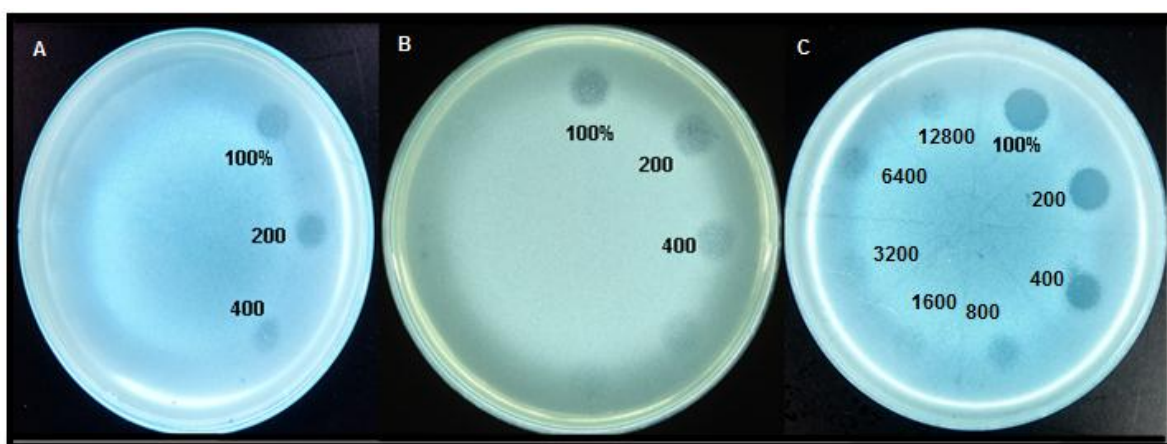
30

Figura 20. Curva de crescimento bacteriano e produção de substância(s) antagonista(s).



5 Curva de crescimento e título antagonista da amostra transconjugante 9, *E. coli* ATCC 25922 conjugada com plasmídio(s) de *S sonnei* SS9 produtora de substâncias antagonistas.

10 Figura 21. Produção de substância(s) antagonista(s) sintetizada pelo transconjugante 9 durante a curva de crescimento bacteriano.



15 Atividade e título antagonista da mostra transconjugante 9, contra a amostra reveladora SS12. **A**, Início da atividade antagonista e título de 400 UA/mL da amostra recuperada na fase lag, com 1h 40min de cultivo; **B**, atividade e título antagonista de 800 UA/mL da amostra obtida após 4h de cultivo; **C**, Atividade e título antagonista de 12.800 UA/mL da amostra recuperada às 8h e 20min de cultivo.

5.6.7 SDS-PAGE

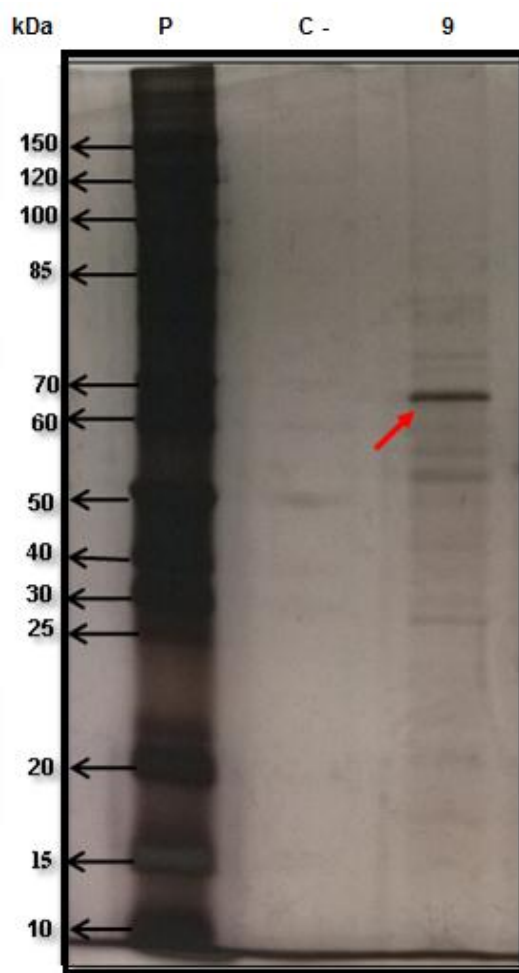
As proteínas presentes no sobrenadante da amostra transconjugante 9 e do controle negativo foram fracionadas na malha do gel de poliacrilamida 12,5%. O sobrenadante da amostra apresentou uma banda proteica, de coloração mais acentuada, com valor estimado entre 60 a 70 kDa, seta vermelha. (FIG. 22). Baseado no posicionamento da banda proteína é possível sugerir que a substância aqui visualizada pode ser a mesma colicina codificada pelo plasmídio 2, com massa molecular de 61,2 kDa, mas para certificarmos do valor da massa molecular da substância, a mesma será analisada por espectrometria de massa.

5.6.8 GEL DE POLIACRILAMIDA REVELADO *IN SITU*

O sobrenadante da amostra transconjugante 9, avaliado em gel de poliacrilamida revelado *in situ*, apresentou uma linha de inibição da amostra reveladora com valor estimado entre 50 e 75 kDa, seta vermelha, FIG. 23. O dado sugere que a biomolécula ativa contra SS12 também foi observada como uma banda de maior intensidade no gel corado por prata (FIG. 22 e 23).

Com base na análise do sequenciamento plasmidial da amostra produtora SS9, no perfil plasmidial da amostra transconjugante 9, na produção de substâncias antagonistas após conjugação, no perfil proteico observado nos geis de poliacrilamida corado pelo método de prata e revelado *in situ*, é possível sugerir que a amostra transconjugante 9 sintetiza a colicina, não nomeada, com massa molecular de 61,2 kDa, presente no plasmídio colicinogênico de 6,134 pb. O mesmo plasmídio também apresenta uma ORF capaz de codificar a síntese da proteína de mobilização A, responsável pela transferência de plasmídios durante os processos de conjugação.

Figura 22. Perfil proteico da amostra transconjugante 9 em SDS-PAGE.



5

P, Padrão de peso molecular Protein Ladder (#SM0661); **C-** controle negativo, caldo TSB; **9**, sobrenadante da cultura da amostra transconjugante 9; Em destaque, uma banda proteica com massa molecular entre 60 a 70kDa, presente no sobrenadante da

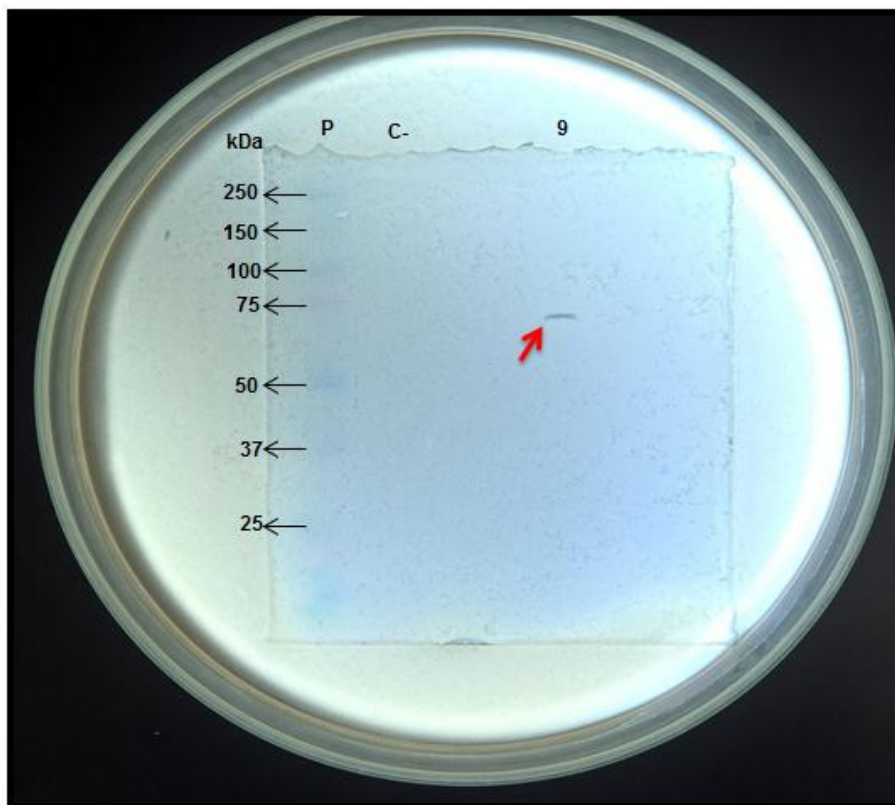
10

amostra

15

Figura 23. Perfil antagonista da amostra transconjugante 9 em gel de poliacrilamida 12,5% revelado *in situ*.

5



10 **P** padrão pré-corado *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (#1610374); **C-**
controle negativo, caldo TSB; **9**, sobrenadante da cultura da amostra transconjugante
9. Em destaque, seta vermelha, uma linha de inibição da amostra reveladora,
15 produzida por uma substância ativa presente no sobrenadante da cultura do
transconjugante 9

15

Os resultados do ensaio de conjugação demonstram a transferência dos
plasmídios colicinogênicos 2 e 3 para a amostra receptora. Embora albergue os dois
20 plasmídios colicinogênicos, foi detectado no sobrenadante da amostra transconjugante

9 apenas uma proteína ativa com massa molecular entre 60 a 70 kDa, o que sugere ser a colicina, não nomeada, com massa molecular de 61,2 kDa. A análise por espectrometria de massa se faz necessária para a determinação da massa molecular, caso o resultado seja favorável, para a colicina aqui mencionada, a mesma poderá ser
5 classificada dentro do grupo das colicinas, após a determinação do receptor responsável pela ligação da molécula na célula alvo.

10 5.7 TRANSFORMAÇÃO

5.7.1 ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS AMOSTRAS ELETROCOMPETENTES

15 O ensaio de atividade antagonista da amostra *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetente evidenciou que a mesma não possui ação inibitória contra a amostra reveladora SS12.

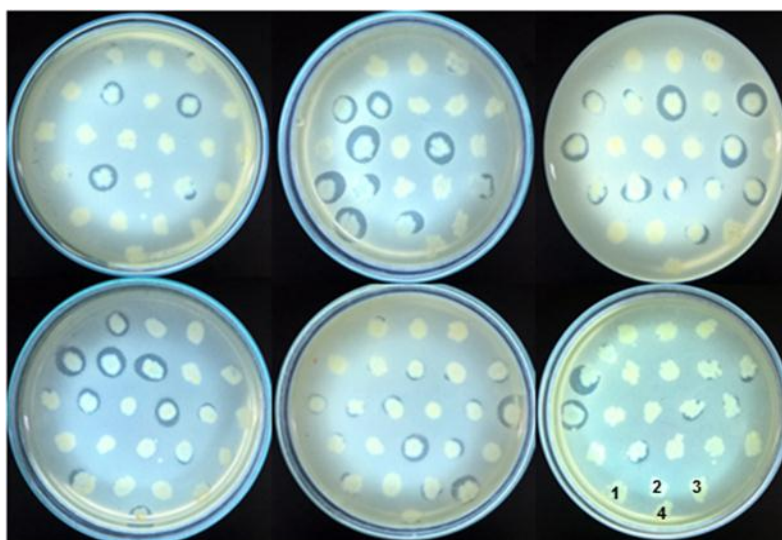
20 5.7.2 TRANSFORMAÇÃO

25 Quatro colônias transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) foram recuperadas em Ágar SOB contendo ampicilina. Nas placas sem antimicrobiano, o número de colônias obtido foi incontável.

5.7.3 ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS AMOSTRAS TRANSFORMANTES

As colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, adquiridas inicialmente do meio sem ampicilina, apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora SS12. Já os quatro transformantes recuperados de meio com antimicrobiano não apresentaram ação antagonista, podendo esses albergar o plasmídio de resistência a antimicrobianos e não os colicinogênicos (FIG. 24). O ensaio de coloração pelo método de Gram evidenciou que todas as amostras em estudo são bastonetes Gram negativos. Resultados similares também foram obtidos por Watson & Visentin (1980), que observaram a transferência da característica expressão de antagonismo após ensaio de transformação com os plasmídios ColE2-P9 e ColE3-CA38 que codificam as colicinas E2 e E3, respectivamente.

Figura 24. Avaliação da atividade antagonista da amostra de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o DNA extracromossômico de *S. sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12.



Presença de halos de inibição de SS12 em amostras recuperadas de meio sem ampicilina. As colônias 1 a 4, obtidas de meio com ampicilina, não são ativas contra a amostra reveladora.

5.7.4 TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO OS PLASMÍDIOS COLICINOGÊNICOS ISOLADOS, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E ANTIBIOGRAMA

5 As células receptoras BL21 (DE3) transformadas, separadamente, com os plasmídios colicinogênicos 2 e 3 foram cultivadas em meio sem antimicrobiano. As culturas foram repicadas, em duplicata, e a ação antagonista foi determinada com uma placa réplica. O ensaio de atividade antagonista de ambos os transformante demonstrou a transferência dos plasmídios colicinogênicos por transformação e a
10 presença da substância ativa contra SS12 (FIG. 25 e 26). Dois transformantes ativos contra SS12, cada um contendo um plasmídio colicinogênico, e *S. sonnei* SS9 foram avaliados em relação à resistência aos antimicrobianos ampicilina e sulfazotrim. A análise demonstrou resistência e sensibilidade, respectivamente, da amostra produtora SS9 e dos transformantes frente aos antimicrobianos (FIG. 27). A análise corrobora os
15 experimentos de sequenciamento do DNA extracromossômico de SS9, demonstrando que os plasmídios colicinogênicos 2 e 3 não possuem genes associados à resistência.

A análise, por espectrometria de massas, das substâncias antagonistas produzidas pelas amostras transformantes que albergam os plasmídios colicinogênicos 2 e 3 estão sendo realizadas. Após a confirmação da síntese da colicina, ainda não
20 nomeada, ensaios para a identificação do receptor serão realizados, bem como, outras técnicas para a identificação do mecanismo e espectro de ação da colicina ainda não caracterizada.

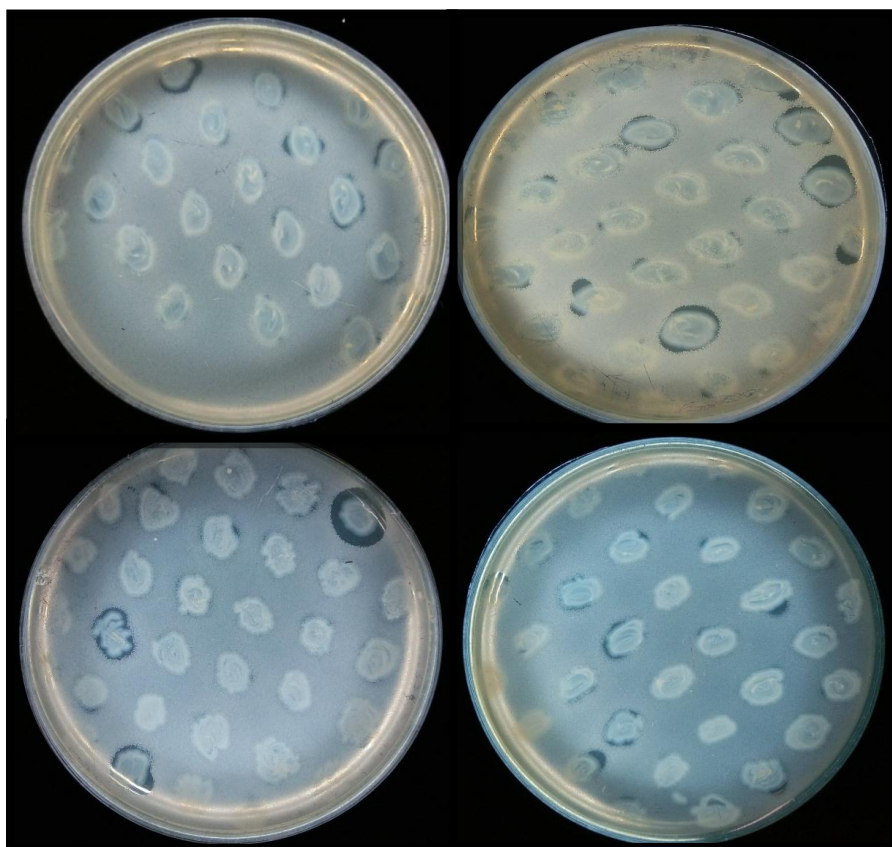
Figura 25. Avaliação da atividade antagonista dos transformantes *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídio colicinogênico 2, originado de *S. sonnei* SS9, contra *S. sonnei* SS12.

5

10

15

20



Avaliação da atividade antagonista da amostra de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídio colicinogênico 2 de *S. sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12. Presença de halos de inibição de SS12 em amostras recuperadas de meio sem ampicilina.

30

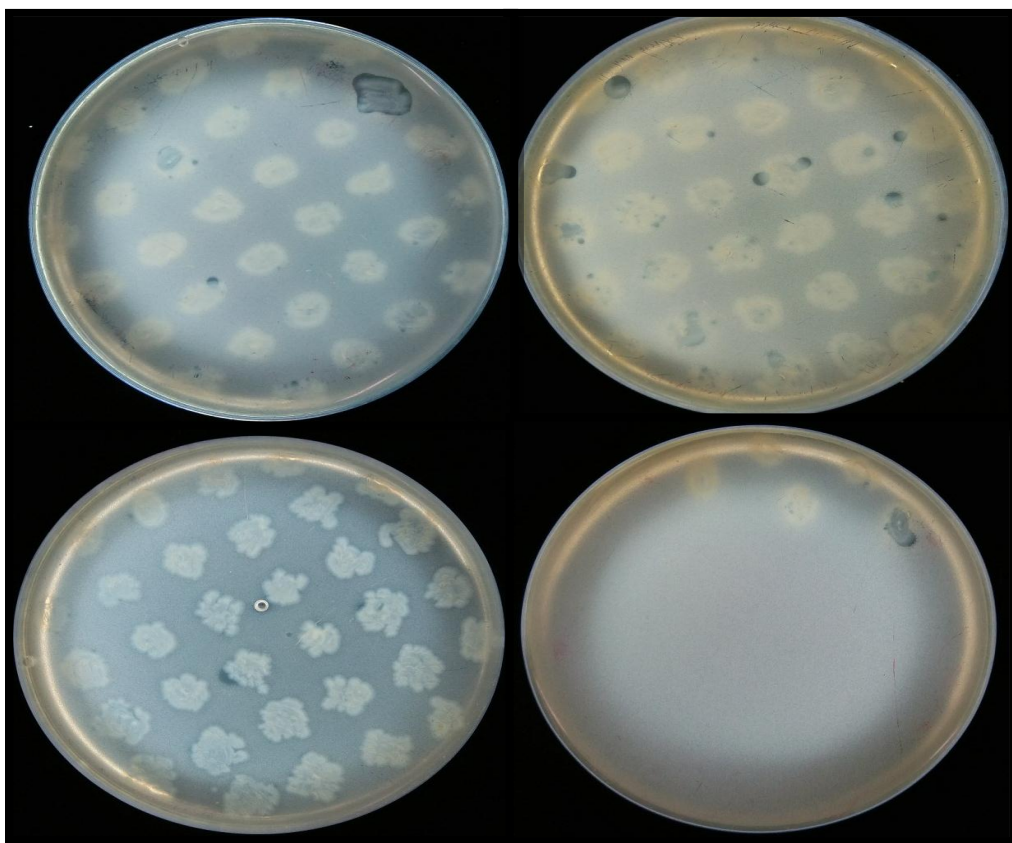
Figura 26. Avaliação da atividade antagonista dos transformantes *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo colicinogênico 3, originado de *S. sonnei* SS9, contra *S. sonnei* SS12.

5

10

15

20

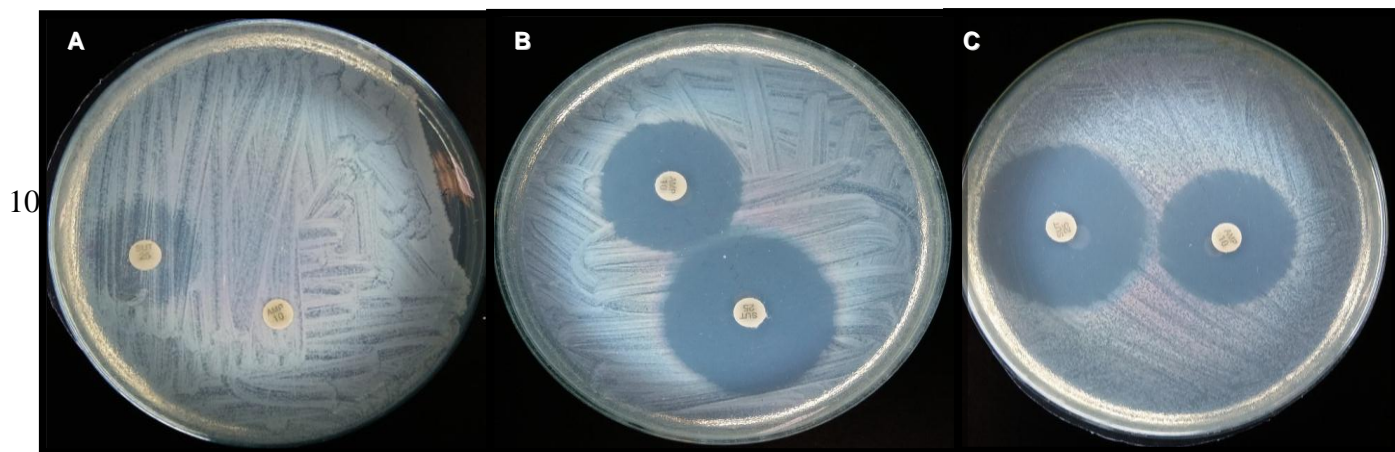


25 Avaliação da atividade antagonista da amostra de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo colicinogênico 3 de *S. sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12. Presença de halos de inibição de SS12 em amostras recuperadas de meio sem ampicilina.

30

Figura 27. Antibiograma das amostras *Shigella sonnei* SS9 e transformantes contendo os plasmídios colicinogênicos 2 e 3.

5



15

Antibiograma em meio Mueller Hinton. A, antibiograma empregando *S. sonnei* SS9 frente aos antibióticos sulfazotrim (SUT) e ampicilina (AMP); B, Halo de inibição da amostra transformante com plasmídio colicinogênico 2 frente aos antimicrobianos sulfazotrim (SUT) e ampicilina (AMP); C, Halo de inibição da amostra transformante com plasmídio colicinogênico 3 frente aos antimicrobianos sulfazotrim (SUT) e ampicilina (AMP).

20

6 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 5 • A amostra *S. sonnei* SS9 isolada de criança com doença diarreica aguda sintetiza composto(s) com ação antagonista contra amostra da mesma espécie.
- 10 • A purificação de sete peptídeos e proteínas pequenas demonstram a síntese, por *S. sonnei* SS9, de mais de uma substância ativa contra a amostra reveladora. Dentre as substâncias purificadas, foram identificadas duas proteínas, no presente trabalho, e uma anteriormente, denominadas proteína tipo histona, proteína fator de promoção da hibernação ribossômica e proteína ribossomal L29, com massas moleculares de 9,2; 10,7 e 7,2 kDa, respectivamente. As demais substâncias serão analisadas por espectrometria de massas e comparação da sequência em banco de dados para a identificação das moléculas.
- 15
- 20 • As substâncias purificadas e identificadas com massas moleculares 7,2, 9,2 e 10,7 kDa, não foram encontradas na literatura como moléculas sintetizadas por *S. sonnei* que possuem ação antagonista contra microrganismos, demonstrando a relevância dos dados.
- 25 • A análise, por sequenciamento de nova geração, do DNA extracromossômico de SS9, identificou a presença de dois plasmídios colicinogênicos. O plasmídio identificado como 2, codifica a produção de uma colicina, com massa molecular de 61,2kDa, ainda não nomeada. O plasmídio 3 sintetiza a colicina E1, com massa molecular de 57,2kDa.
- 30 • A identificação do receptor, localizado na parede celular da bactéria sensível, é peça fundamental para a nomeação da colicina, sendo essa uma das próximas análises com a substância.

- A análise em gel de poliacrilamida corado por prata e revelado *in situ* identificou duas proteínas ativas com massas moleculares 57,4 e 61,6 kDa. Essas substâncias são sugestivas de serem as colicinas mencionadas, para confirmar essa hipótese, a purificação das frações ativas que pode conter as substâncias estão sendo realizadas.
5
- A transferência por conjugação e transformação dos plasmídios colicinogênicos foi realizada. O ensaio de atividade antagonista demonstram a produção de substâncias antagonistas contra SS12, sugestivo de serem as colicinas mencionadas. A análise das substâncias por espectrometria de massas estão sendo realizadas para confirmar essa hipótese. Após a confirmação da síntese da colicina com massa molecular 61,2 kDa, outras metodologias poderam ser empregadas para uma melhor caracterização da molécula.
10

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 ABDEL-MOHSEIN, H.; YAMAMOTO, N.; OTAWA, K.; TADA, C.; NAKAI, Y. Isolation of bacteriocin-like substances producing bacteria from finished cattle-manure compost and activity evaluation against some food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.56, p.151-161, 2010.
- 10 AGEITOS, J. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; CALO-MATA, P.; VILLA, T. G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*, p.1-73, 2016.
- ALFENAS, A. C. & BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. UFV, 1998. p.151-182
- 15 BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharm.* v.6, p.1543-1575, 2013.
- 20 BAKKAL, S.; ROBINSON, S. M.; RILEY, M. A. Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. In: CARVALHO, D. E.; DAVID, G. S.; SILVA, R. J. *Health and Environment in Aquaculture*. In Tech, 2012.p.303-328.
- BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, v. 32, p. 134-142, 2013.
- 25 BALLS, A. K. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.* v.19, p.279–288, 1942.
- 30 BARRY, E. M.; PASETTI, M. F.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A.; KOTLOFF, K. F.; LEVINE, M. M. Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*,v.10, p. 245–255, 2013

- BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, p. 837-848, 2006.
- BELGUESMIA, Y.; CHOISET, U.; PRÉVOST, H.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, J.M.; DRIDER, D. Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: A bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *J Environ Public Health*, v. 2010, p.1-8, 2010.
- BIO-RAD. MicroPulser™ Eletroporation apparatus operating instructions and applications guide. (165-2100 catalog number). U.S.
- BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.11, p.718-724, 1977.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat.* v.3, p.238-250, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAUN, V.; PATZER, S. L. Intercellular communication by related bacterial protein toxins: colicins, contact-dependent inhibitors, and proteins exported by the type VI secretion system. *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 345, p.13-21, 2013.
- CARAYOL, N.; NHIEU, G. T. V.The Inside Story of *Shigella* Invasion of Intestinal Epithelial Cells. *Cold Spring HarbPerspect Med.*, v.3, p.1-13, 2013.

- 5 CARVALHO, K. G.; BAMBIRRA, F. H.; KRUGER, M. F.; BARBOSA, M. S.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, A. M.; NICOLI, J. R.; BEMQUER, M. P.; MIRANDA, A.; SALVUCCI, E.J.; SESMA, F. J.; FRANCO, B.D. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *J Industrial Microbiol Biotechnol.*,v. 37, p.381-390, 2010.
- 10 CARVALHO, K. G.; BAMBIRRA, F. H.; NICOLI, J. R.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, A. M.; BEMQUER, M. P.; MIRANDA, A.; FRANCO, B. D. Characterization of multiple antilisterial peptides produced by sakacin P-producing *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Arch Microbiol.* v. 4, p. 635-644, 2018.
- 15 CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 71, p.158–229, 2007.
- CALCUTTAWALA, F.; HARIHARAN, G.; PAZHANI, G. P.; SAHA, D. R.; RAMAMURTHY, T. Characterization of e-type colicinogenic plasmids from *Shigella sonnei*. *Fems microbial Lett.*, v.364, p.1-9, 2017.
- 20 CHEN, W. H. & KOTLOFFA, K. L. *Shigella* vaccine development: finding the path of least resistance. *Clin. Vaccine Immunol.*, p.1-12, 2016.
- 25 CHIKINDAS, M. L., WEEKS, R., DRIDER, D., CHISTYAKOV, V. A., & DICKS, L. M. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.*, v.49, p.23–28, 2018.
- CLEVELAND, J. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. of Food Microbiol.*, v. 71, p.1-20, 2001.
- 30 Clinical And Laboratory Standards Institute. *M100-S15: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio: norma aprovada.* v. 23, 2003, p.177.

- Clinical And Laboratory Standards Institute. *M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. v. 38, ed. 28, 2018. p.296.
- 5 CORSINI, G.; KARAHANIAN, E.; TELLO, M.; FERNANDEZ, K.; RIVERO, D.; SAAVEDRA, J. M.; FERRER, A. Purification and characterization of the antimicrobial peptide Microcin N. *FEMS Microbiol Lett.*, v.312, p.119-125, 2010.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Micro*, v. 11, p.95-105, 2013.
- 10 DAS, A.; NATARAJAN, M.; MANDAL, J. The emergence of quinolone resistant *Shigella sonnei*, Pondicherry, India. *PLoS One.*, v.11, p.1-11, 2016.
- 15 DAW, M. A.; FALKINER, F. R. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. *Micron.*, v.27, p.467-479,1996.
- DICKS, L. M. T.; HEUNIS, D. A.; STADEN, V.; BRAND, A.; SUTYAK, N.; CHIKINDAS, M. L. Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*.Springer. 2011. p. 391-421.
- 20 DUGGAN, G. M.; MOSTOWY, S. Use of zebrafish to study *Shigella* infection. *Dis Model Mech.*, v.11, p.1-11, 2018.
- 25 DUPONT, H. L.; LEVINE, M. M.; HORNICK, R. B.; FORMAL, S. B. Inoculum size in Shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis.*, v. 159, p. 1126-1128, 1989.
- 30 DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod Rep.*, v. 24, p. 708–734, 2007.

- EVERSE, J.; STOLZENBACH, F. E. Lyophilization. In: JAKOBY, W. B. (Ed.) *Methods Enzymol.*, v.22, p.33-39, 1971.
- ELLEN, A. F.; ROHULYA, O. V.; FUSETTI, F.; WAGNER, M.; ALBERS, S. V.;
5 DRIESSEN, A. J. M. The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J. Bacteriol*, v. 193, p. 4380–4387, 2011.
- ETAYASH. H.; AZMI, S.; DANGETI, R.; KAUR, K. Peptide Bacteriocins - structure activity relationships. *Curr Top Med Chem*. v.16, p. 220-241, 2016.
- 10 FAHIM, H. A.; KHAIRALLA, A. S.; EL-GENDY, A. O. Nanotechnology: A Valuable Strategy to Improve Bacteriocin Formulations. *Front Microbiol.*, v.7, p.1-12, 2016.
- FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; CISALPINO, E. O.;
15 VIEIRA, E. C. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. *Res. Microbiol.*, v.143, p.151-159, 1992.
- FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M. S.; CARVALHO, M. A. R. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain
20 of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. *Res. Microbiol.*, v.145, p.9-16, 1994.
- FRANKEN, L. E.; FRANKEN, G. T.; PIJNING, T.; PURI, P.; ARKHIPOVA, V.;
BOEKEMA, E. J.; POOLMAN, B.; GUSKOV, A. A general mechanism of ribosome dimerization revealed by single-particle cryo-electron microscopy *Nat Commun.*, v. 722,
25 p.1-11, 2017.
- GALVÉZ, A.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R. Food applications and regulation. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011.p. 353-390.
- 30 GARCÍA-BAYONA L, GUO SM, LAUB TM. Contact-dependent killing by *Caulobacter crescentus* via cell surface-associated, glycine zipper proteins. *Elife.*, p.1-26, 2017.

- GARCIA-GUTIERREZ, E., MAYER, M. J., COTTER, P. D., & NARBAD, A. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*, v. 27, p.1–21, 2018.
- GIARDINA, B.; MESSANA, I.; SCATENA, R.; CASTAGNOLA, M. The Multiple
5 Functions of Hemoglobin. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* v.30, p.165–196, 1995.
- GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, v. 84, p.577-592, 2002.
- 10 GHEQUIRE, M. G. K.; BUCHANAN, S. K.; DE MOT, R. The ColM Family, Polymorphic Toxins Breaching the Bacterial Cell Wall. *MBio.*, v.9, p. 1-11, 2018.
- GHEQUIRE, M. G. K. & DE MOT, R. Turning Over a New Leaf: Bacteriocins Going Green. *Trends Microbiol.* , v. 26. P.1-2, 2018.
- 15 GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,v. 81, p.591-606, 2009.
- GONZÁLEZ-TORRALBA, A., GARCÍA-ESTEBAN, C., ALÓS, J. I. Enteropatógenos y
20 antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v.36, p.47-54, 2018.
- GRINTER, R.; MILNER, J.; WALKER, D. Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. *Plos ONE*, v. 7, p.1-9, 2012.
- GROVE, A. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr Issues Mol
25 Biol.*, v.13, p.1-12, 2011.
- GUPTA, A.; GUPTA, R.; KURWARDKAR, S. Liposome-encapsulated antimicrobial peptides: Potencial infectious diseases therapy. In: SONI S, SALHOTRA A, SUAR M. *Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering.* Springer, 2014, p.301-332.
- 30 HAMMAMI, R.; FERNANDEZ, B.; LACROIX, C.; FLISS, I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 70, p. 2947–2967, 2013.

- HOLT, K. E.; BAKER, S.; WEILL, F. X.; HOLMES, E. C.; KITCHEN, A.; YU, J.; SANGAL, V.; BROWN, D. J.; COIA, J. E.; KIM, D. W.; CHOI, S. Y.; KIM, S. H.; SILVEIRA, W. D.; PICKARD, D. J.; FARRAR, J. J.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.;
5 THOMSON, N. R. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nat. Genet.*,v. 44, p. 1056- 1061, 2012.
- HOLT, K. E.; NGA, T. V. T.; THANH, D. P.; VINH, H.; KIM, D. W.; TRA, M. P. V.;
10 CAMPBELL, J. L.; HOANG, N. V. M.; VINH, N. T.; MINH, P. V.; THUY, C. T.; NGA, T. T. T.; THOMPSON, C.; DUNG, T. T. N.; NHU, N, T. K.; VINH, P. V.; TUYET, P. T. N.; PHUC, H. L.; LIEN, N. T. N.; PHU, B. D.; AI, N. T. T.; TIEN, N. M.; DONG, N.; PARRY, C. M.; HIEN, T. T.; FARRAR, J. J.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.;THOMSON, N. R.; BAKER. S. Tracking the establishment of local endemic populations of an emergent
15 enteric pathogen. *PNAS.*, v. 110, p.17522-17527, 2013.
- JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH. A.; WOLLMAN, E. Definition of some terms relative to lysogeny. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. v. 84, p.222-224,1953.
- 20 JAKES, K. S. The Colicin E1 TolC Box: Identification of a Domain Required for Colicin E1 Cytotoxicity and TolC Binding. *J. Bacteriol.*, v.199, p.1-13; 2017.
- JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol.Rev.*,v. 28, p. 43-58, 2004.
- 25 JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clin microbiol ver.*, v. 19, p. 491–511, 2006.
- JENSSEN, H.; HANCOCK, R.E.W. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*,
30 v.91, p.19–29, 2009.

- JEŻOWSKA-BOJCZUK, M. .; STOKOWA-SOŁTYS, K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. *Eur J Med Chem.*, v.143, p.997-1009, 2018.
- 5 JOH, R. I.; HOEKSTRA, R. M.; BARZILAY, E. J.; BOWEN, A.; MINTZ, E. D.; WEISS, H.; WEITZ, J. S. Dynamics of shigellosis epidemics: estimating individual-level transmission and reporting rates from national epidemiologic data sets. *Am J Epidemiol.*, v. 178, p. 1319-1326, 2013.
- 10 KAŠKONIENĖ, V.; STANKEVIČIUS, S.; BIMBIRAITĖ-SURVILIENĖ, K.; NAUJOKAITYTĖ, G.; ŠERNIENĖ, L.; MULKYTĖ, K.; MALAKAUSKAS, M.; MARUŠKA, A. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 101, p.1-13, 2017.
- 15 KAUR, S.; KAUR, S. Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front Pharmacol.*, v. 6, p.1-12, 2015.
- KAUR, K.; TARASSOVA, O.; DANGETI, R. V.; AZMI, S.; WISHART, D.; MCMULLEN, L.; STILES, M. Characterization of a highly potent antimicrobial peptide microcin N from uropathogenic **Escherichia coli**. *FEMS.*, v. 363, p. p.1-6, 2016.
- 20 KHAN, S.; SINGH, P.; ANSARI, M.; ASTHANA, A. Isolation of *Shigella* species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal. *Asian Pac J Trop Dis.*, v.4, p.30-34, 2014.
- 25 KIM, H. J.; YOUN, S. K.; LEE, S.; CHOI, Y. H. Epidemiological characteristics of Imported Shigellosis in Korea, 2010 e 2011. *Osong Public Health Res Perspect.*, v. 4, p. 159-165, 2013.
- 30 KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* v.70, p. 337-349, 1988.

- KOTLOFF, K. L., RIDDLE, M. S., PLATTS-MILLS, J. A., PAVLINAC, P., & ZAIDI, A. K. M. Shigellosis. *Lancet*. v.391, p.801-812, 2018.
- LAGOS, R.; TELLO, M.; MERCADO, G.; GARCÍA, V.; MONASTERIO, O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 10, p.74-85, 2009.
- LAMBORO, T.; KETEMA, T.; BACHA, K. Prevalence and antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Shigella* species isolated from outpatients, jimma university specialized hospital, Southwest Ethiopia. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*, v.2016, p.1-8, 2016.
- LEDERBERG, J.; E. M. LEDERBERG. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* v.63, p. 399-406, 1952.
- LEE, D. G.; KIM, H. N.; PARK, Y.; KIM, H. K.; CHOI, B. H.; CHOI, C. H.; HAHM, K. S. Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2–20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. *Biochem Biophys Acta*, v.1598, p.185-194, 2002.
- LEE, T.; HALL, K. N.; AGUILAR, M. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Curr Top Med Chem*. v.16, p. 25-30, 2016.
- LOHANS, C. T.; VEDERAS, J. C. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.* v. 2012, p.1-13, 2012.
- LU, H.; ZHU, Y.; XIONG, J.; WANG, R.; JIA, Z. Potential extra-ribosomal functions of ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Res.*, v.177, p.28-33, 2015.
- MAHMOUD, R. Y.; LI, W.; ELDOMANY, R. A.; EMARA, M.; YU, J. The *Shigella* proU system is required for osmotic tolerance and virulence. *Virulence*. v.24, p.1-13, 2016.

- MAJEED, H.; GILLOR, O.; KERR, B.; RILEY, M. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J*, v. 5, p. 71-81, 2011.
- 5 MARTEYN, B. S.; GAZI, A. D.; SANSONETTI, P. J. *Shigella*: A model of virulence regulation in vivo. *Gut Microbes*, v. 3, p. 104-120, 2012.
- MAVRIDOU, D.A.I.; GONZALEZ, D.; KIM, W.; WEST, S. A.; FOSTER, K.R. Bacteria Use Collective Behavior to Generate Diverse Combat Strategies. *Curr Biol.*, v.28, p.345-255, 2018.
- 10 MCCRICKARD, L. S.; CRIM, S. M.; KIM, S.; BOWEN, A. Disparities in severe shigellosis among adults - Foodborne diseases active surveillance network, 2002-2014. *BMC Public Health*. v. 18, p.1-8, 2018.
- 15 MCKAY, S. L.; PORTNOYA, D. A Ribosome Hibernation Facilitates Tolerance of Stationary-Phase Bacteria to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. v.59, p. 6992-6999, 2015.
- 20 MEI, S.; SUN, C.; LIU, X.; LU, Q.; CAI, L.; LI, Y.; XIANG, H. The helix-loop-helix Motif at the N Terminus of hall is essential for its immunity function against Halocin C8. *J. Bacteriol*, v.190, p. 6501–6508, 2008.
- 25 MEYER, R. Identification of the mob Genes of Plasmid pSC101 and Characterization of a Hybrid pSC101-R1162 System for Conjugal Mobilization. *J. Bacteriol*. v. 182, p.4875-4881, 2000.
- 30 MOKHTARI, W.; NSAIBIA, S.; MAJOURI, D.; HASSEN, A. B.; GHARBI, A.; AOUNI, M. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. *J Appl Microbiol.*, v. 113, p. 209-222, 2012.
- MOREIRA, J. S. Extração, Purificação e caracterização de substância antagonista produzida por *Shigella sonnei*. 2011. 40f. Monografia (Especialização em Microbiologia

Aplicada à Ciência da Saúde) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

5 MOREIRA, J. S. Caracterização da primeira microcina e de outras bacteriocinas sintetizadas por *Shigella sonnei*. 242f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

10 NES, I. F. History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 3-12.

15 NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, v.29, p. 464–472, 2011.

NISHIE, M.; NOGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*, v.17, p.1-16, 2012.

20 NIYOGI, S. K. Shigellosis. *J. Microbiol.*, v. 43, p. 133-143, 2005.

25 NORIEGA, J. M. S. Mecanismos de interacción entre la microcina 24 y su célula bacteriana blanco. 2009. 93f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas, Universidad De Chile, Santiago de Chile. 2009.

NUNES, R. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; PENNA, F. J.; NUNES, J. M. M.; MENDES E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. *J Pediatr.*, v.88, p.125-128, 2012.

30 NYGREN, B. I.; SCHILLING, K. A.; BLANTON, E. B.; SILK, B. J.; COLE, D. J.; MINTZ, E. J. Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998–2008. *Epidemiol. Infect.*, v.1, p. 1- 9, 2012.

- OLIVEIRA, P. L. Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostra de *Shigella sonnei* isolada de criança com diarreia aguda. 2013. 191. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- 5
- PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C. A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem Biophys Res Commun.*,v.218, p.408-413, 1996.
- PARK, C,B.; YI, K.S.; MATSUZAKI, K.; KIM, M.S.; KIM, S.C. Structure activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Nat Acad Sci*, v.97 p.3245–3250, 2000.
- 10
- PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 252, p.11-18, 2005.
- 15
- PHALIPON, A.; SANSONETTI, P.J. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? *Immunol Cell Biol.*, v. 85, p.119–129, 2007.
- 20
- PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. Antimicrobial peptides: Their history, evolution, and functional promiscuity. In: Phoenix, D. A., DENNISON, S. R. AND HARRIS, F. *Antimicrobial Peptides*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013a, p.1-37.
- 25
- PUZARI, M.; SHARMA, M.; CHETIA, P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. *J Infect Public Health.*, v.11, p.451-454, 2018.
- PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. Anionic antimicrobial peptides In: Phoenix, D. A., DENNISON, S. R. AND HARRIS, F. *Antimicrobial Peptides*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013b, p.1-37.
- 30

- PRICE, L. B.; SHAND, R. F. Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol.*, v.182, p. 4951–4958, 2000.
- 5 RATTRAY, A. M.; MÜLLER, B. The control of histone gene expression. *Biochem Soc Trans.* v.40, p.880-885, 2012.
- REA, M. C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D.; HILL, C. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011.p. 29-53.
- 10 REBUFFAT, S. Bacteriocin from Gram-negative bacteria: A classification? In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011a. p. 55-71.
- 15 REBUFFAT, S. Microcins from Enterobacteria: on the edge between Gram positive bacteriocins and colicins. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011b. p. 333-349.
- REBUFFAT, S. Microcin in action: amazing defence strategies of enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, v.40, p. 1457-1462, 2012.
- 20 REID, G.; YOUNES, J. A.; MEI, H. C. V.; GLOOR, G. B.; KNIGHT, R.; BUSSCHER, H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol.*, v.9, p. 27-38, 2011.
- 25 RILEY, A. M.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Rev. Microbiol.*, v.56, p.117–137, 2002.
- RILEY, A. M. Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. *Oxford: Elsevier*. v.5, p. 32-30 44, 2009.

- RILEY, A. M. Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from Genes to Applications*.Springer. 2011. p. 13-26.
- 5 RILEY, A. M.; ROBINSON, S. M.; ROY, C. M.; DENNIS, M.; LIU, V.; DORIT, R. L. Resistance is futile: the bacteriocin model for addressing the antibiotic resistance challenge. *Biochem. Soc. Trans.*, v.40, p. 1438–1442, 2012.
- ROBINETTE, D.; WADA, S.; ARROLL, T.; LEVY, M. G.; MILLER, W. L.; NOGA, E. J.
- 10 Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. v. 54, p. 467-475, 1998.
- ROSENBERG, I, M. Electrophoretic techniques. In: ROSENBERG, I, M. *Protein analysis and purification*. Birkhauser, 1996. p.55-98.
- 15
- SACK, D. V.; HOQUE, A. T. M. S., HUQ, A.; ETHERIDGE, M. Is protection against shigellosis induced by natural infection with *Plesiomonas shigelloides*? *Lancet*, v. 343, p.1413-1415, 1994.
- 20
- SANG, Y.; BLECHA. F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev*. v.9, p.227–235, 2008.
- SASAKAWA, C. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought throught the study of
- 25 *Shigella*. *Proc. Jpn. Acad.*, v. 86, p. 229-243, 2010.
- SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D.J.; FORMAL, S. B. *Shigella sonnei* Plasmids: Evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infect Immun.*, v.34, p.75-83, 1981.
- 30
- SAYEED, S.; SACK, D. A.; QADRL, F. Protection from *Shigella sonnei* infect ion by Immunization of rabbits with *Plesiornonas shigelloides* (SVC 01). *J. Med. Microbiol.*,v.37, p.382-384, 1992.

- SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alim. Nutr* .v.14, p. 229-235, 2003.
- 5 SCHNEIDER, T.; HAHN-LÖBMANN, S.; STEPHAN, A.; SCHULZ, S.; GIRITCH, A.; NAUMANN, M.; KLEINSCHMIDT, M.; TUSÉ, D.; GLEBA, Y. Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathovars. *Sci Rep*. v.8, p. 1-10, 2018.
- 10 SCOCCHI, M.; MARDIROSSIAN, M.; RUNTI, G.; BENINCASA, M. Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. *Curr Top Med Chem*. v.16, p. 76-88, 2016.
- 15 SEO, J.-K., LEE, M. J.; JUNG, H.-G.; GO, H.-J.; KIM, Y. J.; PARK, N. G. Antimicrobial function of SH β AP, a novel hemoglobin β chain-related antimicrobial peptide, isolated from the liver of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Fish Shellfish Immunol*. v.37, p.173–183, 2014.
- 20 SEO, J.; KIM, D.; OH, R.; PARK, K.; LEE, I.; CHO, S.; LEE, K.;NAM, B. Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*. v.67, p. 675-683. 2017.
- 25 SEVERINOV, K.; SEMENOVA, E., KAZAKOV, T. Class I microcins: their structures, activities, and mechanisms of resistance In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011.p.289-308.
- SEVERINOV, K.; NAIR, S. K. Microcin C: biosynthesis and mechanisms of bacterial resistance. *Future Microbiol.*,v.7, p.281-289, 2012.
- 30 SETHUVE, D. P. M.; RAGUPATHI, N. K. D.; ANANDAN, S.; VEERARAGHAVAN, B. Update on: *Shigella* new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. *Lett Appl Microbiol*. v.64, p.8-18, 2017.

- SHI, W.; CAIYUN, L.; MAN, L.; XICUI, Z.; DONGJU, H.; YUQING, C. Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in Rice. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 100, p. 5059–5067, 2016.
- 5 SIT, C. S.; VEDERAS, J. C. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.* v.86, p. 116-123, 2008.
- SINGH, V. P. Recent approaches in food bio-preservation. *Open Vet J.* , v.8, p.104-111, 2018.
- 10 ŠMAJS, D.; MICENKOVÁ, L.; ŠMARDA, J.; VRBA, M.; ŠEVCÍKOVÁ, A.; VALIŠOVÁ, Z.; WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol.*, v.10, p. 1-10, 2010.
- 15 ŠMAJS, D.; EJKOVÁ, D. C.; MICENKOVÁ, L.; BITTENCOURT, C. I. L.; SOUZA, E. C.; ŠMARDA, J.; NASCIMENTO, A. M. A. Human *Escherichia coli* strains of different geographical and time source: bacteriocin types and their gene sequences are population-specific. *Environ Microbiol Rep*, v.4, p. 459-466, 2012.
- 20 SMIRNOV, I. P.; ZHU, X.; TAYLOR, T.; HUANG, Y.; ROSS, P.; PAPAYANOPOULOS, I. A.; MARTIN, S. A.; PAPPIN, D. J. Suppression of r-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* v.76, p.2958-2965, 2004.
- 25 SOUSA, M. A. B. Atividade antagonista de amostras de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*: extração, purificação, e caracterização de bacteriocinas. 93f. Qualificação (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.
- 30 SOUSA, M. A. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of

- children with acute diarrhoea. *APMIS: Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 118, p. 125-135, 2010.
- 5 SOUSA, M. A. B.; NUNES, M. R. C. M.; MENDES, E. N.; PÉRET-FILHO, L. A.; PENNA, F. J.; MAGALHÃES, P. P. Resposta dos autores. *J. Pediatr.*, v.188, p. 367-368, 2012.
- 10 SOUSA, M. A. B.; FARIAS, L. M.; OLIVEIRA, P. L.; MOREIRA, J. S.; APOLÔNIO, A. C. M.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; MENDES, E. N.; MAGALHÃES, P. P. Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei* identification of a putative new bacteriocin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.108, p.724-729,21013a.
- 15 SOUSA, M. A. B., MENDES, E. N.; COLLARES, G. B.; PÉRET-FILHO, L. A.; PENNA, F. J.; MAGALHÃES, P. P. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.108, p.30-35, 2013b.
- SREENIVASAN, S.; KALI, A.; PRADEEP, J. Multidrug resistant *Shigella flexneri* infection simulating intestinal intussusception. *J Lab Physicians*. v. 8, p. 55–57, 2016.
- 20 SUDA, S.; FIELD, D.; BARRON, N. Antimicrobial Peptide Production and Purification. In: WALLS, D.; LOUGHRAN, S. T. *Protein Chromatography*. Springer, 2017. p. 401-410.
- 25 TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.*, v.40, p.722-756, 1976.
- TUNON, P. & JOHANSSON K. E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.9, p.171-179, 1984.
- 30 ULLAL, A.J.; LITAKER, R. W.; NOGA, E.J. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Dev Comp Immunol*, v.32, 1301-1312, 2008.

- VASSILIADIS, G.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J. Class II microcins. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 309-332.
- 5 VINH, H.; NHU, N. T. K.; NGA, T. V. T.; DUY, P. T.; CAMPBELL, J. I.; HOANG, N. V. M.; BONI, M. F.; MY, P. V. T.; PARRY, C.; NGA, T. T. T.; MINH, P. V.; THUY, C. T.; DIEP, L. T.; CHINH, M. T.; LOAN, H. T.; THAM, N. T. H.; LANH, M. N.; MONG, B. L.; ANH, C. T. C.; BAY, P. V. B.; CHAU, N. V. V.; FARRAR, J.; BAKER, S. A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. *BMC Infect Dis.*, v.9, p.204-216, 2009.
- 10 WATANABE, T.; FUKASAWA, T. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I transfer of resistance factors by conjugation. *J Bacteriol.*, v.81, p.668-678, 1960.
- 15 WATSON, R.; VISENTIN, L. P. Restriction endonuclease mapping of ColE2-P9 and ColE3-CA38 plasmids. *Gene*, v.10, p. 307-318, 1980.
- 20 WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci.*, v.120, p.118-132, 2016.
- 25 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality. Department of vaccines and biologicals. Geneva, Switzerland, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics (2017).
- 30 YAGURA, M.; ITOH, T. The Rep protein binding elements of the plasmid ColE2-P9 replication origin. *Biochem Biophys Res Commun.* v.345, p.872-877, 2006.

- YAH, C. S. Plasmid-Encoded Multidrug Resistance: A Case study of *Salmonella* and *Shigella* from enteric diarrhea sources among humans. *Biol Res.*; v. 43: p.141-148, 2010.
- 5 YAMADA, M.; EBINA, Y.; MIYATAT, T.; NAKAZAWA,T.; NAKAZAWA, A. Nucleotide sequence of the structural gene for colicin E1 and predicted structure of the protein. *Proc. Natl. Acad.*, v.79, p. 2827-2831, 1982.
- 10 YANG, S, C.; LIN, C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.*, v.5, p. 1-10, 2014.
- 15 ZAMAROCZY, M.; CHAULEAU. M. Colicin killing: Foiled cell defense and hijacked cell functions. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011. p.255-287.
- ZHAO, Z.; ORFE, L. H.; LIU, J.; LU, S.-Y.; BESSER, T. E.; CALL, D. R. Microcin PDI regulation and proteolytic cleavage are unique among known microcins. *Sci Rep.*, v.7, p.1-14, 2017.
- 20 ZHANG, L .J.; GALLO, R .L. Antimicrobial peptides. *Curr Biol*, v.26, p.14– 19, 2016.
- 25 ZSCHÜTTIG, A.; ZIMMERMANN,K.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; PÖHLMANN, C.; GUNZER, F. Identification and characterization of microcin S, a new antibacterial peptide produced by probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLoS One*, v.7, p.1-9, 2012.

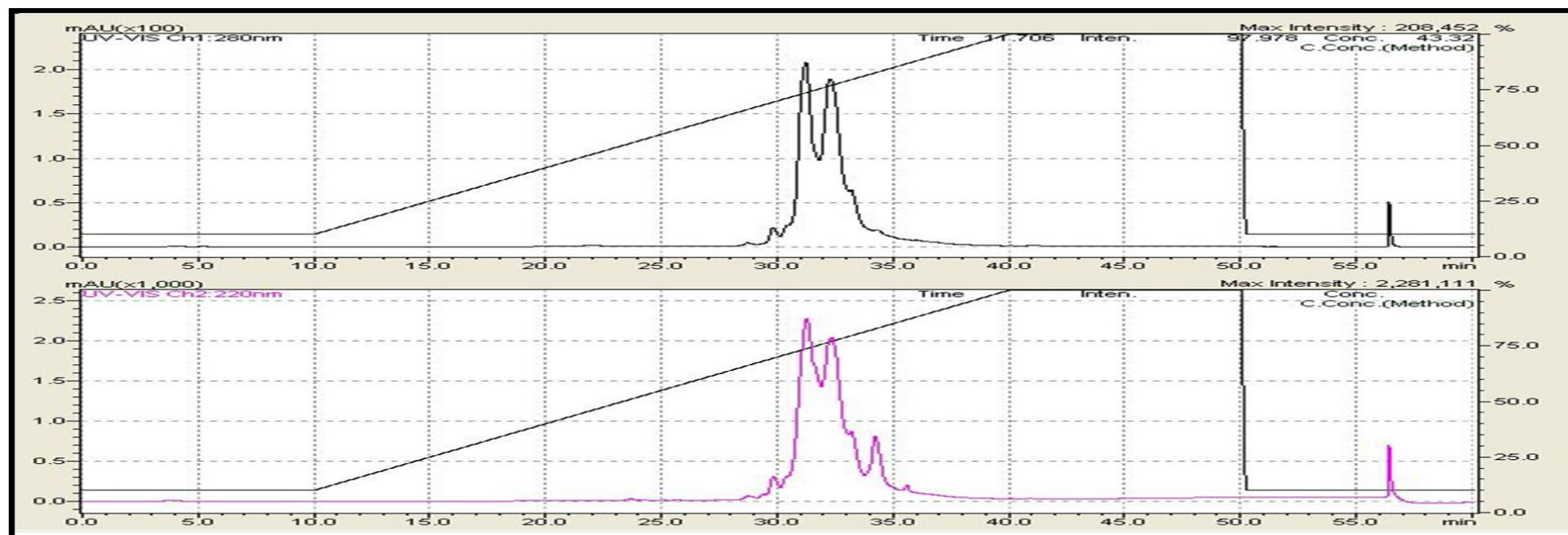
5

10

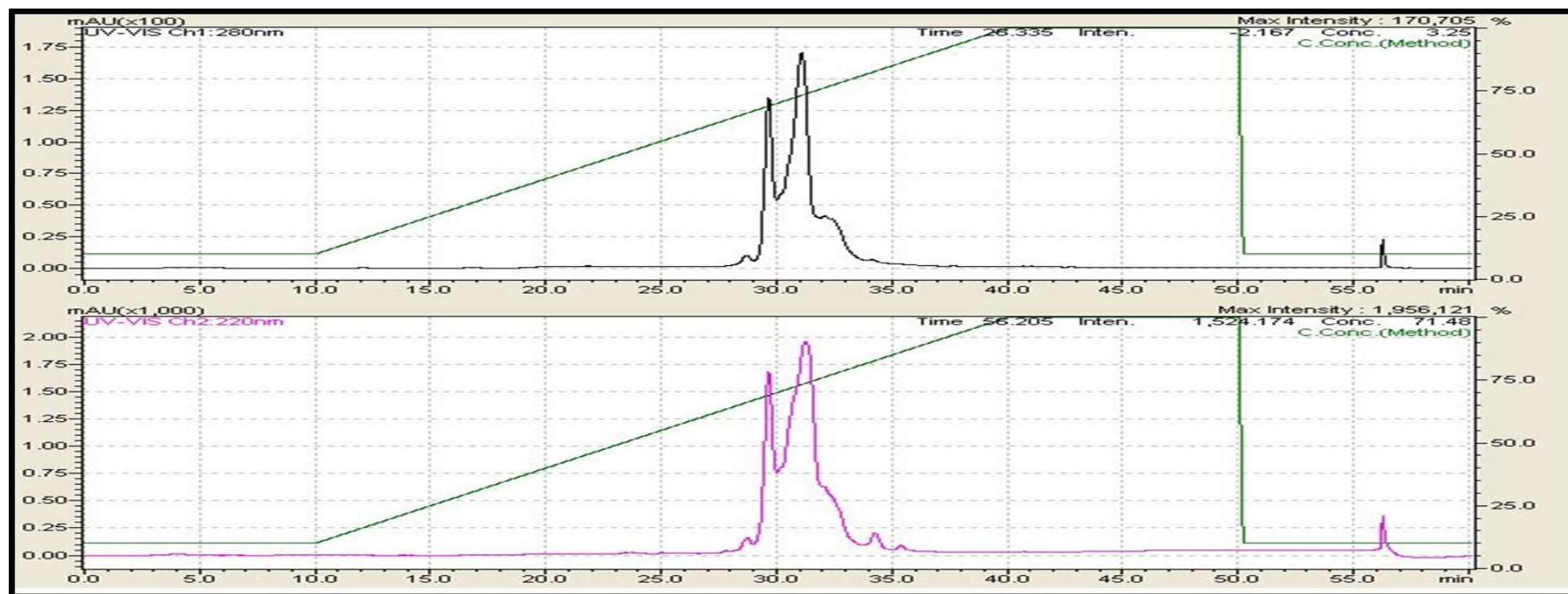
15

20

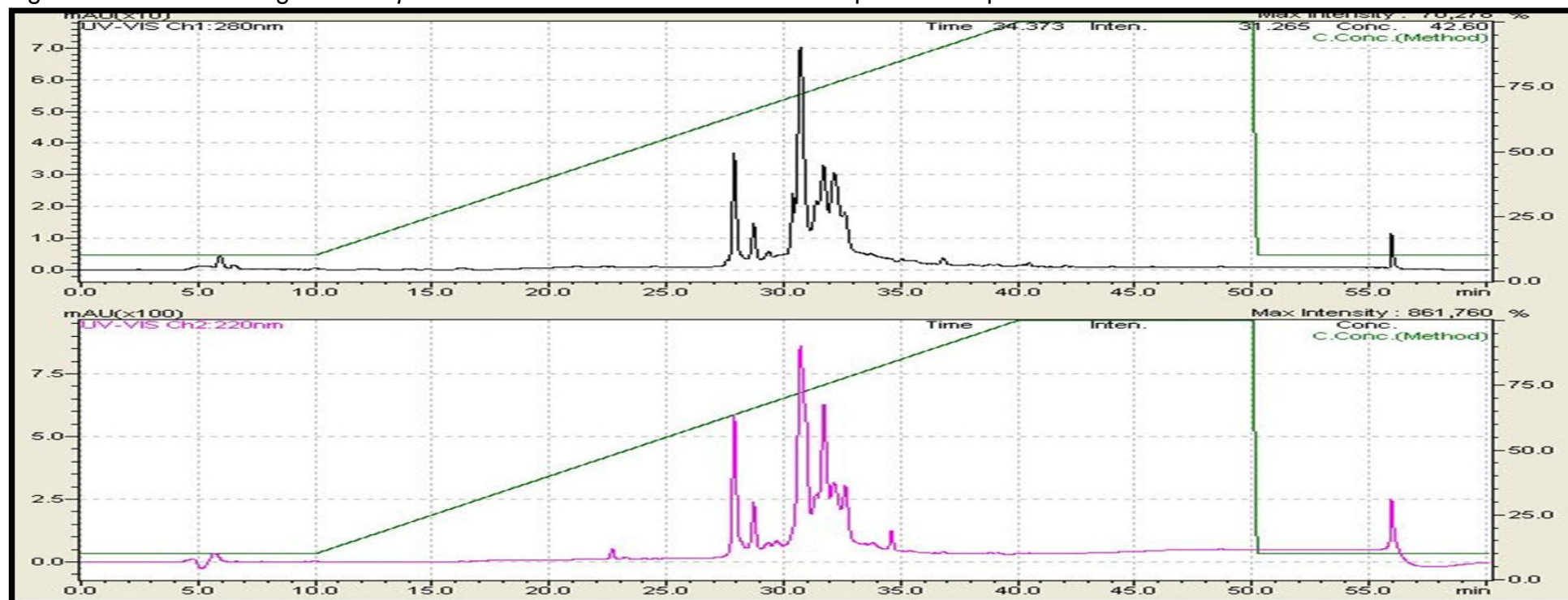
APÊNCIDE I

Figura 1. Perfil cromatográfico do *pool*/FR1 em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

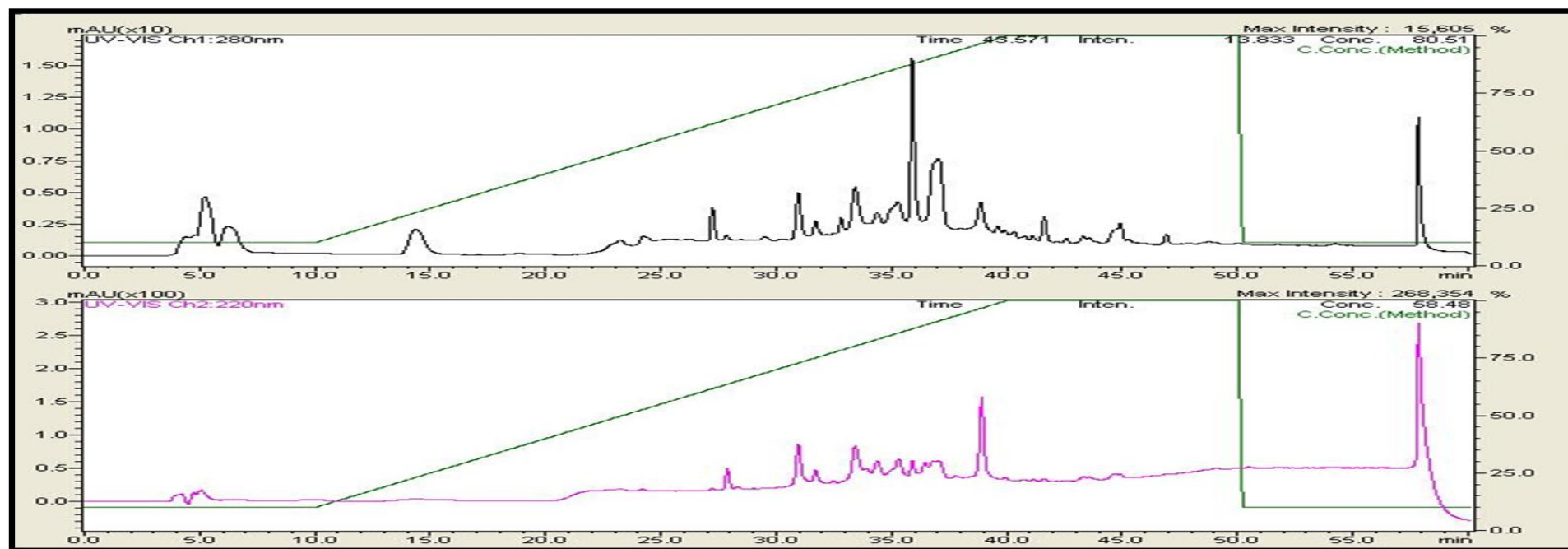
Cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 do *pool*/FR1 [Origem: fração FR1 (frações B11 a B14) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/GF1 (frações 2 a 6) da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]. Coluna Sephasil™ Peptide C18 eluída com solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 33 a 40 apresentaram atividade antagonista contra SS12, e, dentre essas, as frações 37 a 39 apresentaram os melhores resultados de purificação.

Figura 2. Perfil cromatográfico do *pool*/FR2 em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

Cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 do *pool*/FR2 [Origem: fração FR2 (fração B15) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/GF1 (frações 2 a 6) da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]. Coluna Sephasil™ Peptide C18 eluída com solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 34 a 36 apresentaram atividade antagonista contra SS12 e os melhores resultados de purificação.

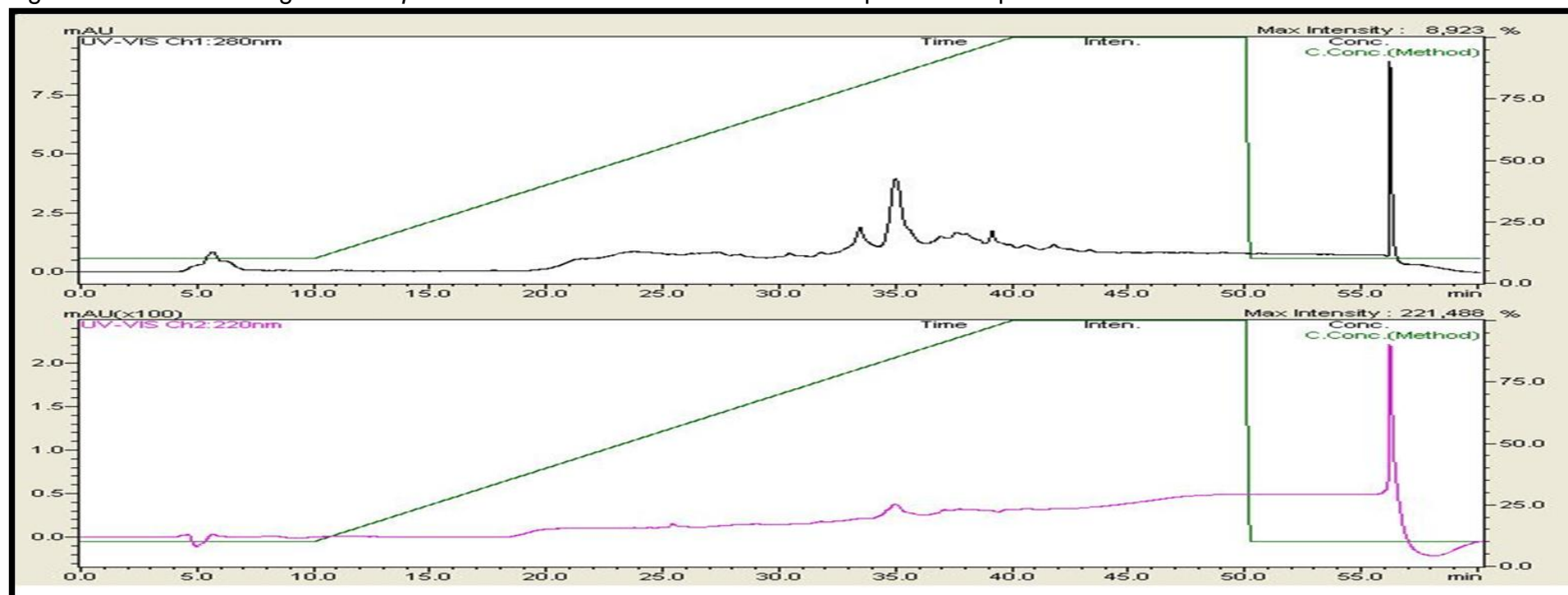
Figura 3. Perfil cromatográfico do *pool*/FR3 em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

Cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 do *pool*/FR3 [origem: fração FR3 (frações C1, C2 e C3) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/GF2 (frações 7 a 9) da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]. Coluna Sephasil™ Peptide C18 eluída com solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 34 e 35, 37 a 40, 57 e 58 apresentaram atividade antagonista contra SS12 e os melhores resultados de purificação.

Figura 4. Perfil cromatográfico do *pool*/FR4 em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.

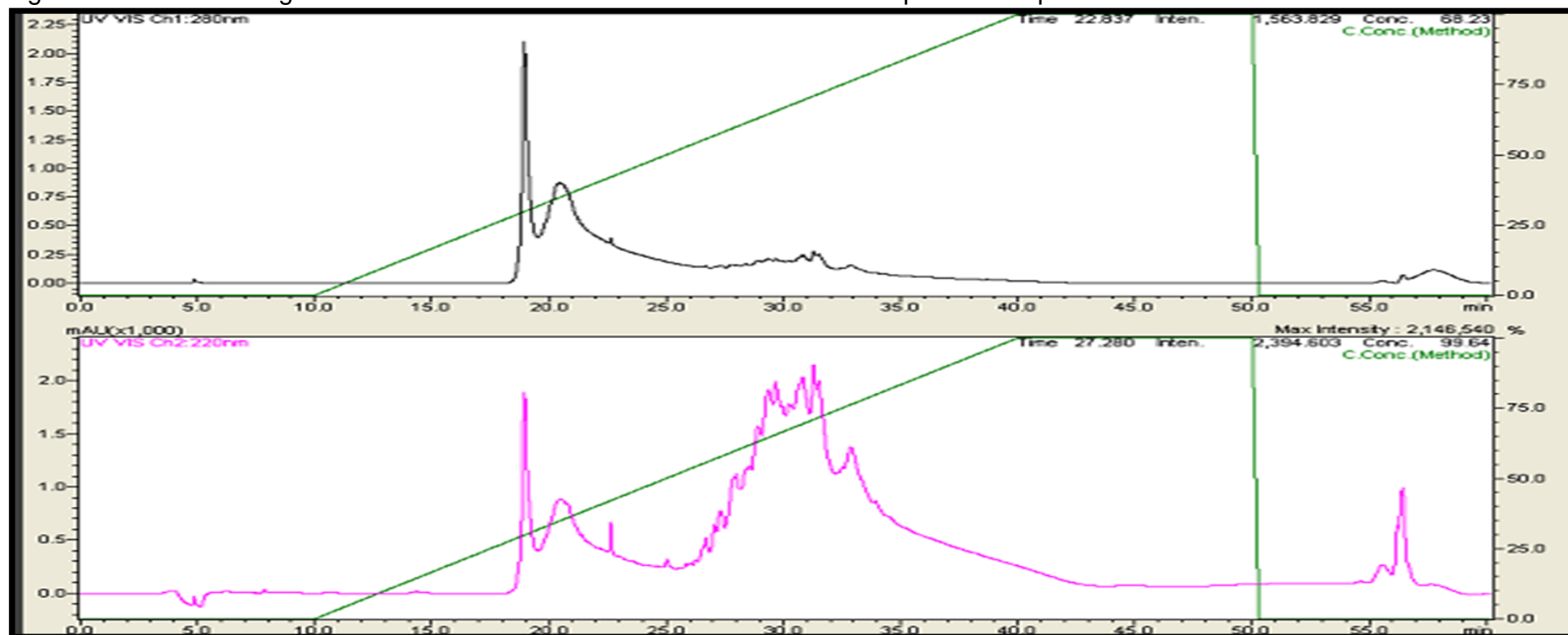
Cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 do *pool*/FR4 [origem: fração FR4 (frações C4 a C10) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/GF2 (frações 7 a 9) da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]. Coluna Sephasil™ Peptide C18 eluída com solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 33 a 40, 55 a 58 apresentaram atividade antagonista contra SS12, e, dentre essas, as frações 34, 36 e 37 os melhores resultados de purificação.

Figura 5. Perfil cromatográfico do *pool*/FR6 em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.



Cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 do *pool*/FR6 [origem: fração FR6 (frações C1 e C2) da cromatografia de fase reversa Supelco C-8 - *pool*/GF4 (fração11) da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7) da cromatografia 5 de troca iônica – extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio]. Coluna Sephasil™ Peptide C18 eluída com solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 35 a 40 apresentaram atividade antagonista contra SS12, e, dentre essas, as frações 35 e 37 os melhores resultados de purificação.

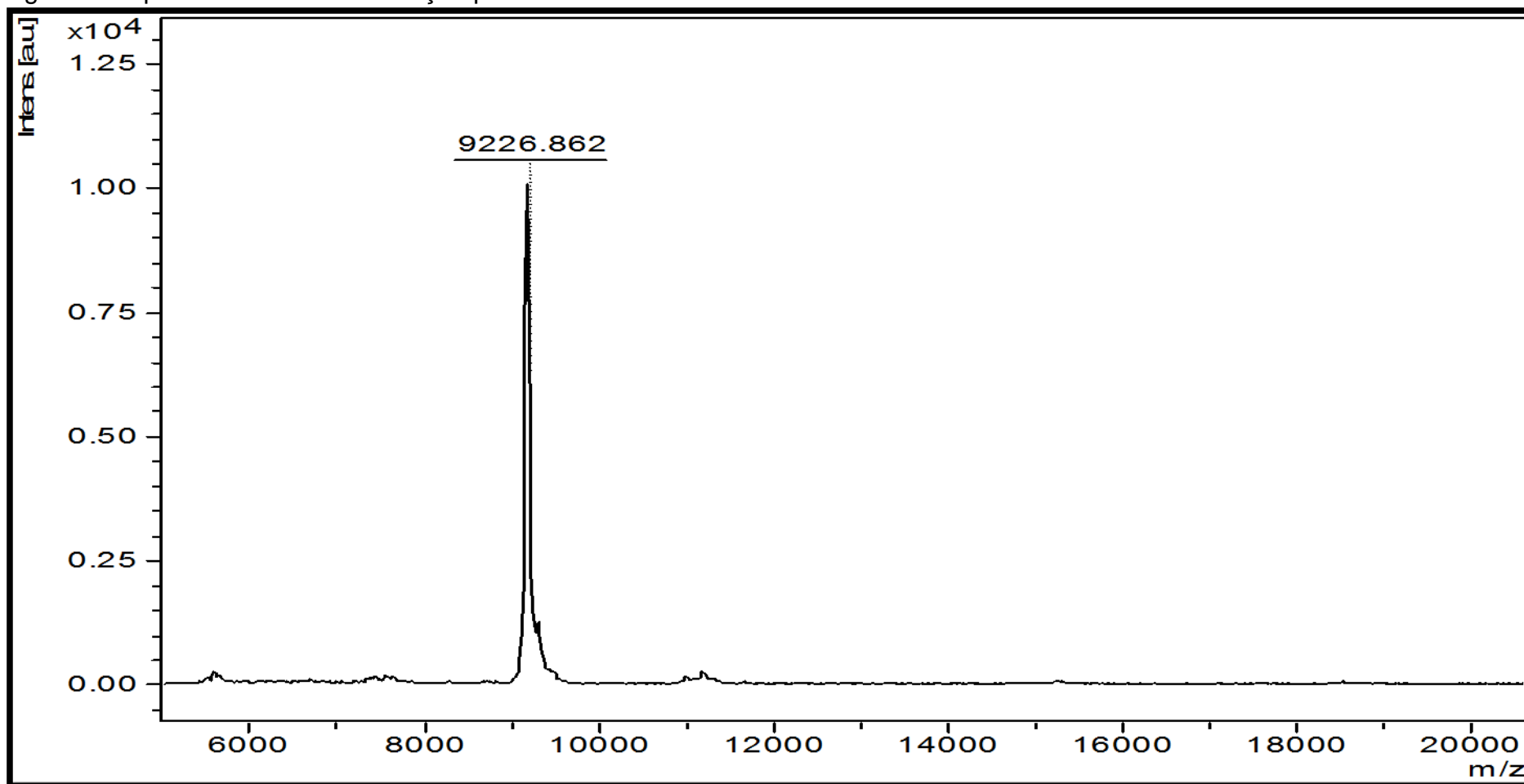
Figura 6. Perfil cromatográfico da amostra 26h em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18.



Cromatografia em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 da amostra 26h [origem: SS12 utilizada como matriz de afinidade].

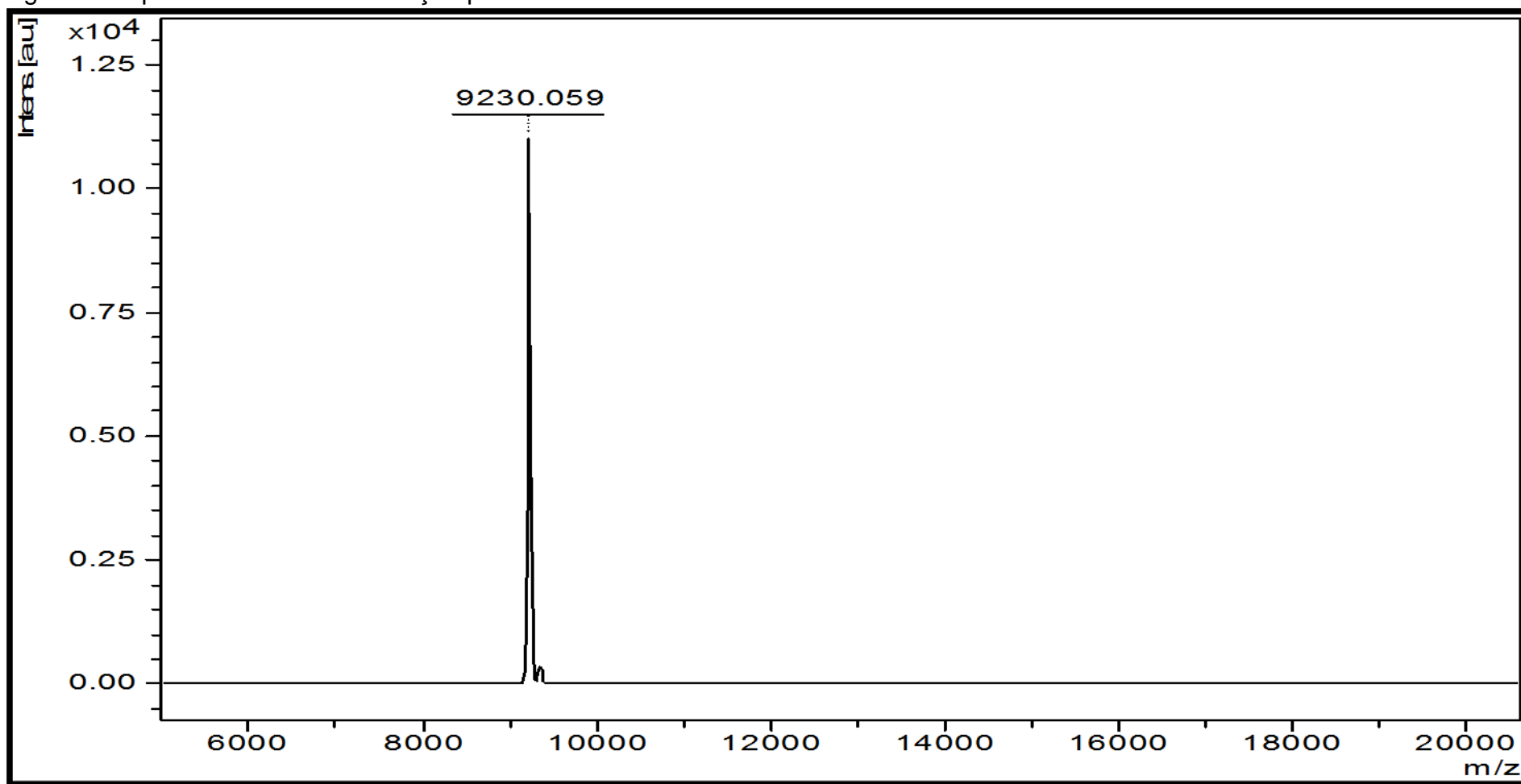
Coluna Sephasil™ Peptide C18 eluída com solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) e 5 equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 32 a 36 e 58 apresentaram atividade antagonista contra SS12, e, dentre essas, as frações 35 e 37 os melhores resultados de purificação.

Figura 7. Espectro de massas da fração purificada FR7.



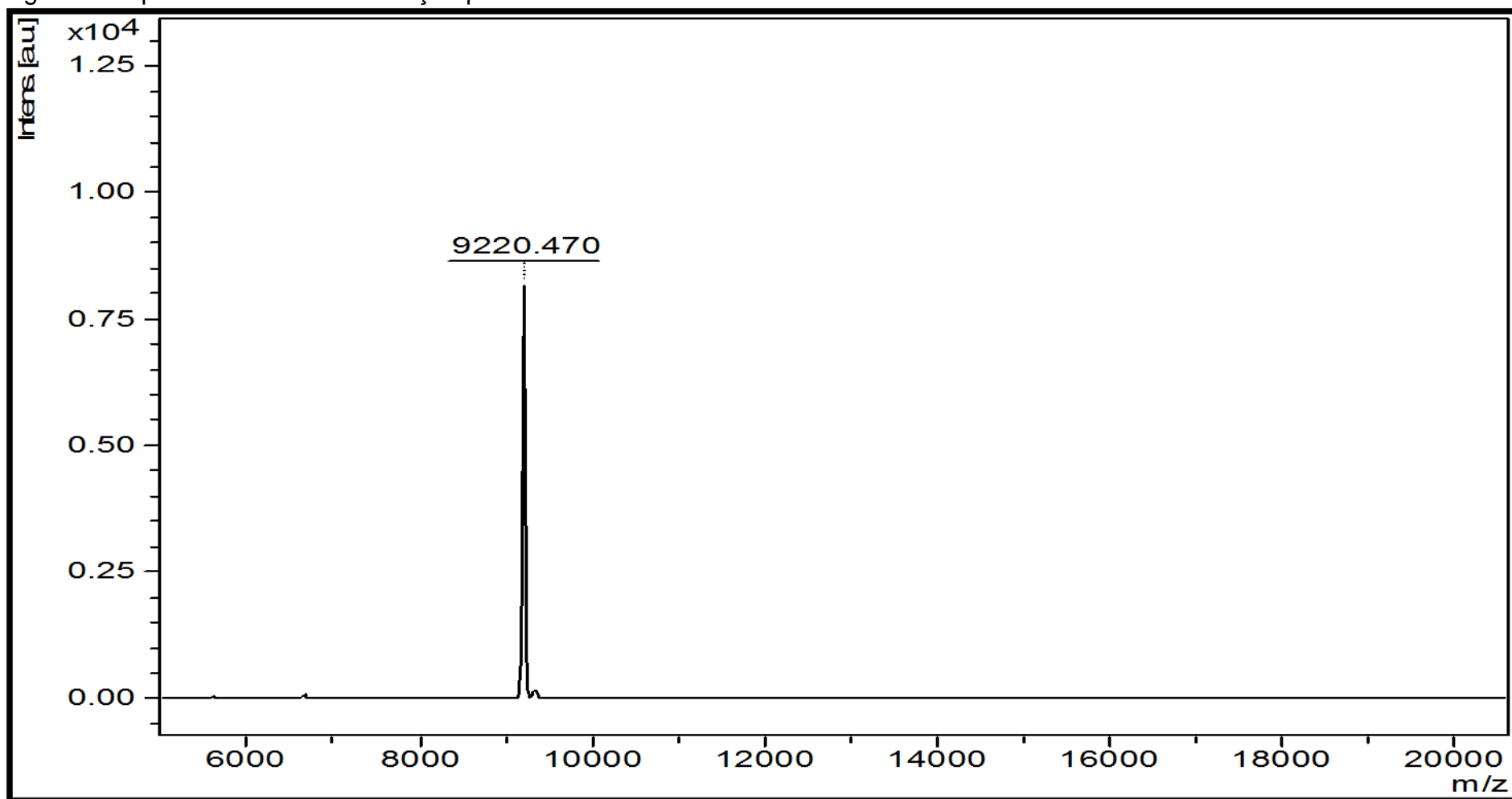
Espectro de massas da amostra FR7: massa molecular 9226,8 Da. [origem: fração 37 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool*/FR1 (frações B11 a B14 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 8. Espectro de massas da fração purificada FR8.



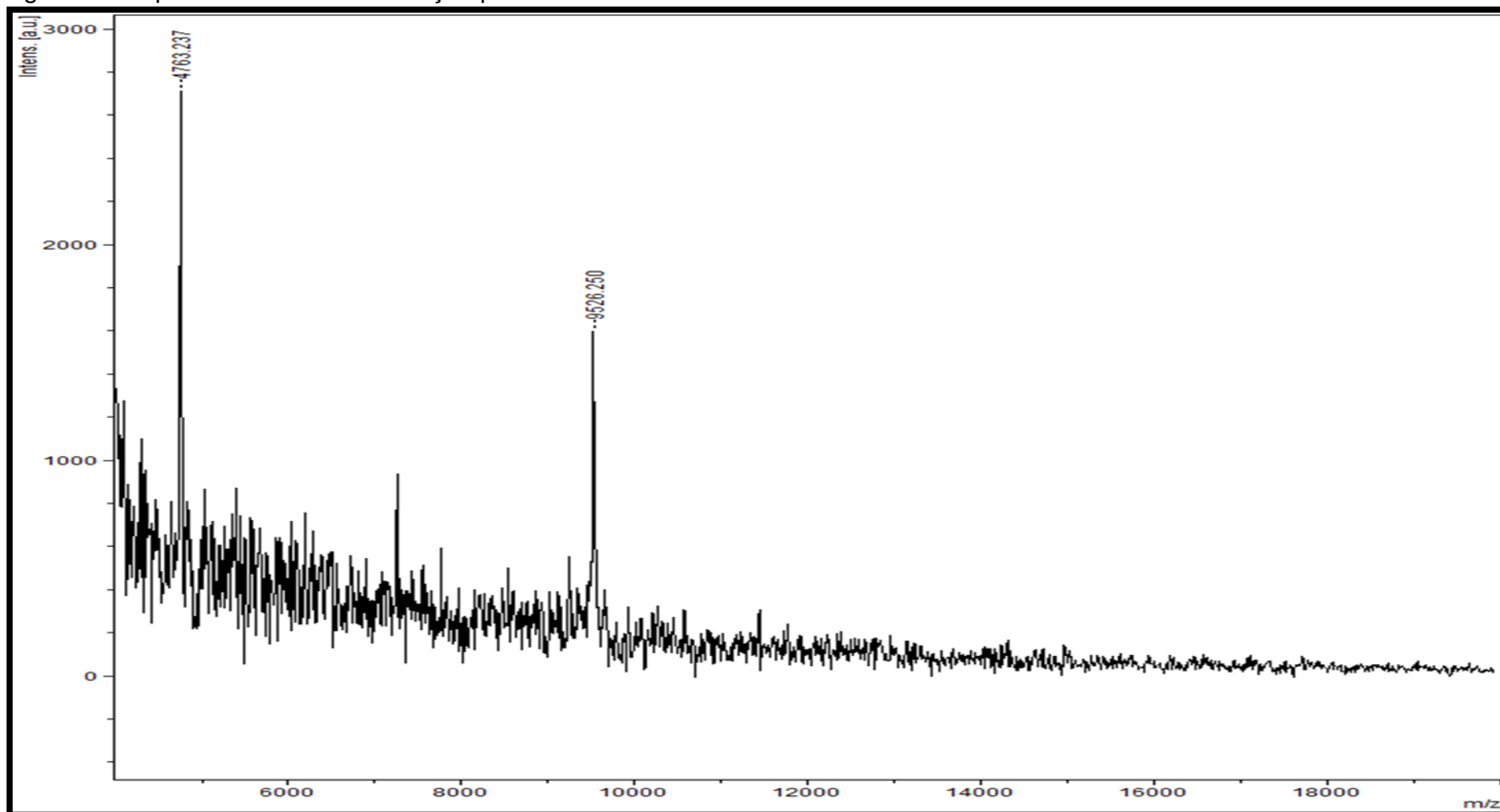
Espectro de massas da amostra FR8: massa molecular 9230,0 Da. [origem: fração 38 da cromatografia de fase reversa Peptide
5 C18 – *pool* FR1 (frações B11 a B14 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de
exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 9. Espectro de massas da fração purificada FR9.



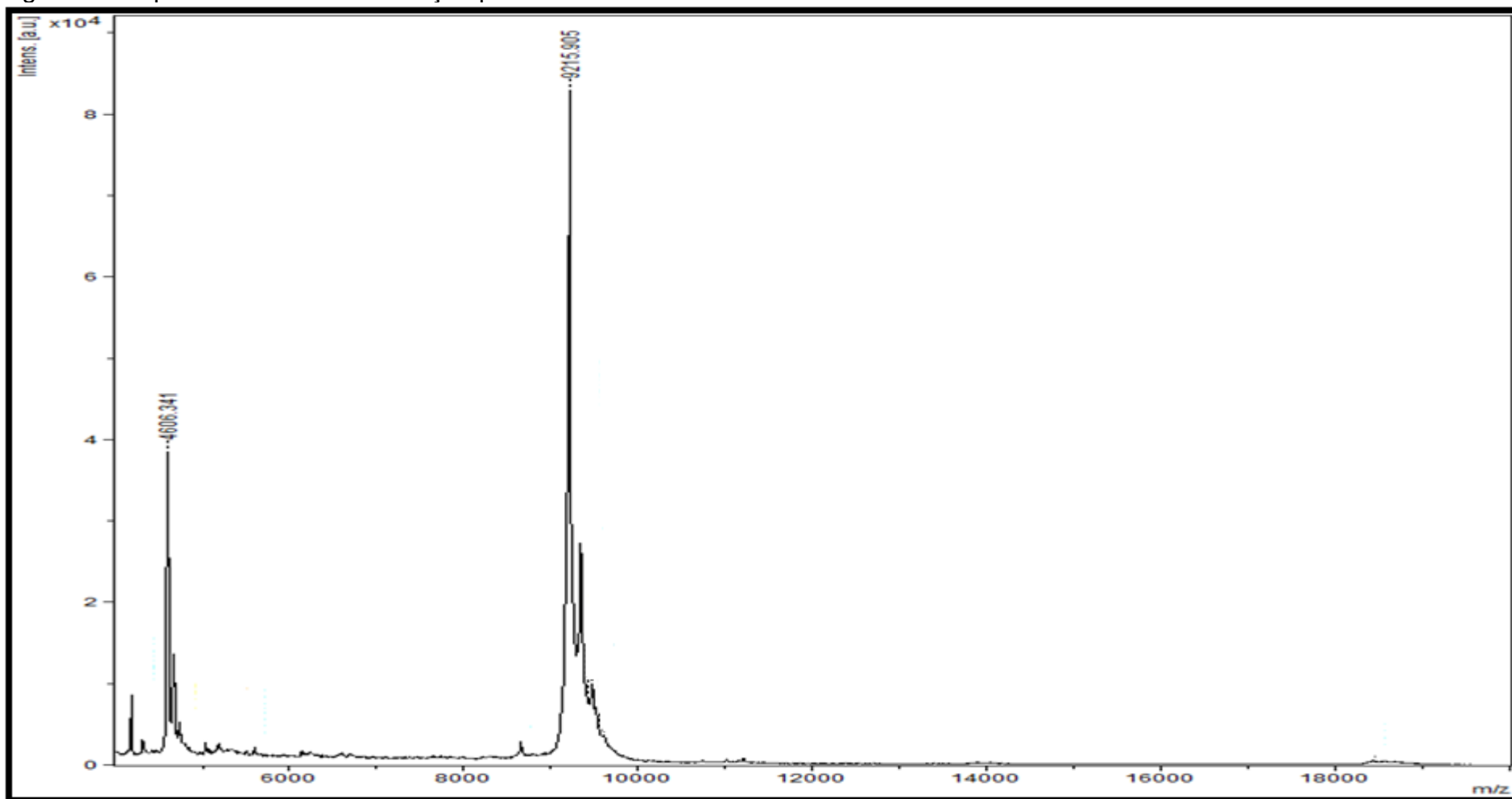
Espectro de massas da amostra FR9: massa molecular 9220,6 Da. [origem: fração 39 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR1 (frações B11 a B14 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 10. Espectro de massas da fração purificada FR10.



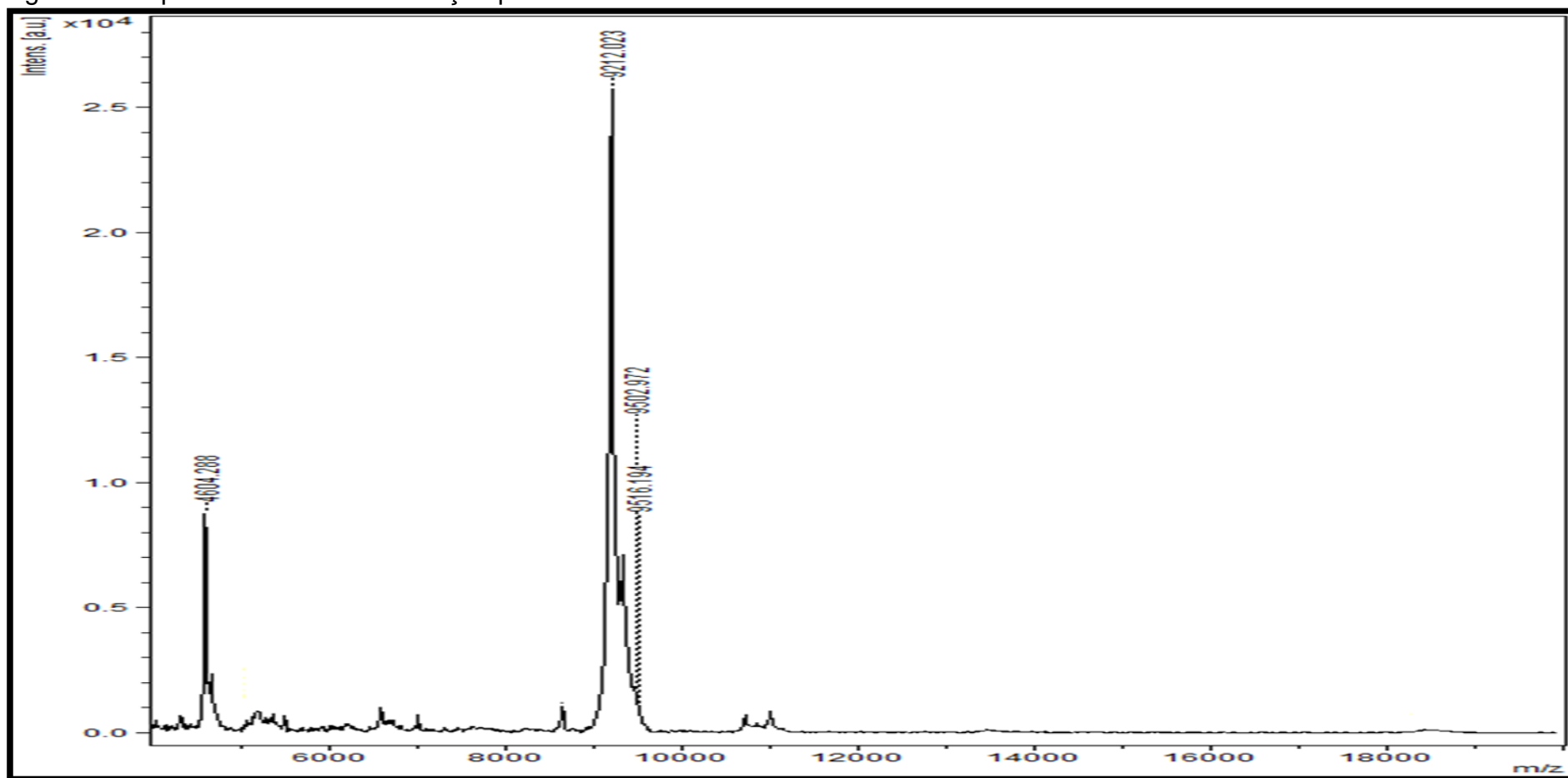
Espectro de massas da amostra FR10: massas moleculares 4763,2 e 9526,2 Da. [origem: fração 34 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – FR2 (fração B15 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/ GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/ TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 11. Espectro de massas da fração purificada FR11.



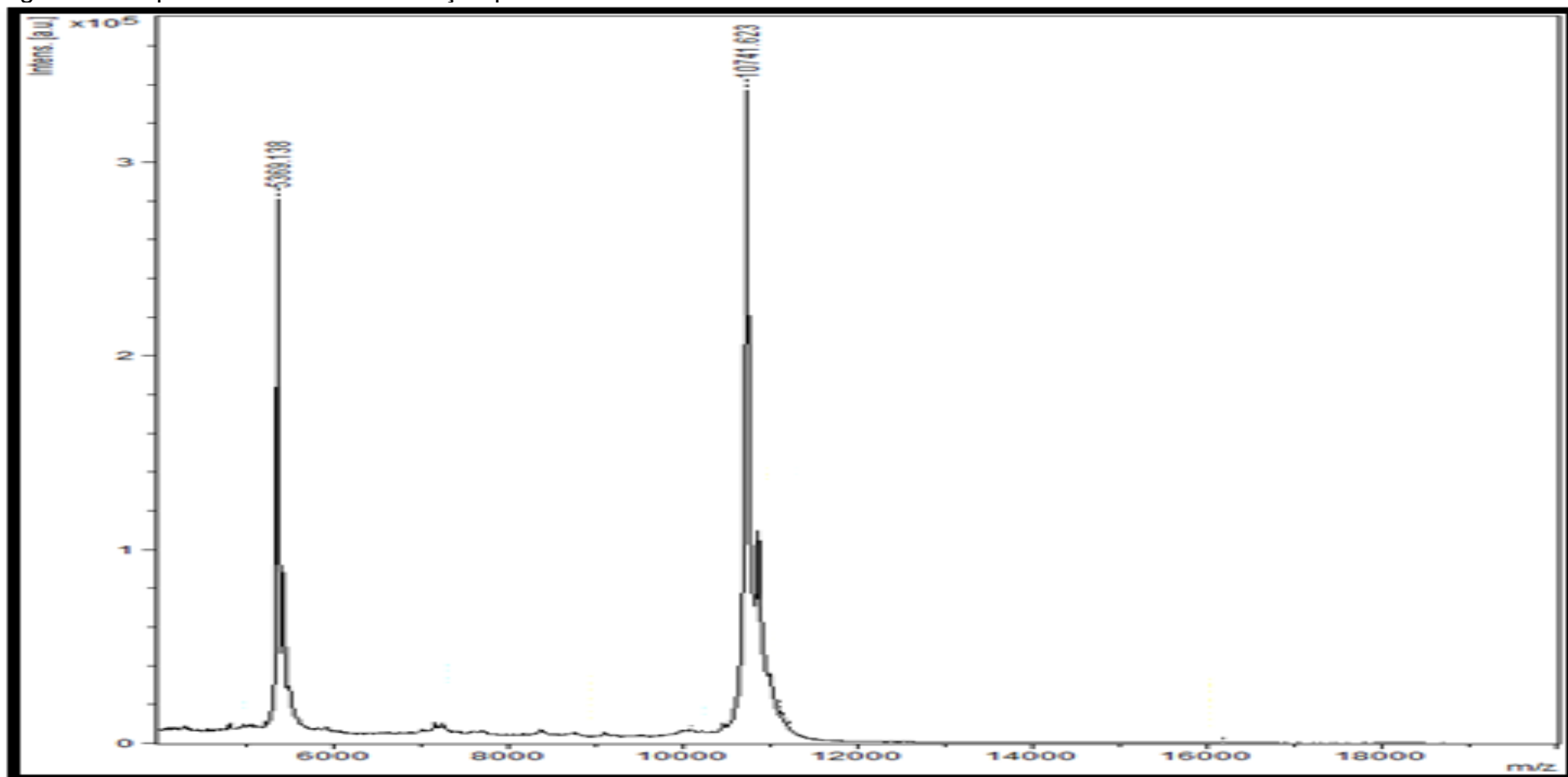
Espectro de massas da amostra FR11: massas moleculares 4606,3; 9215,9 Da. [origem: fração 35 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – FR2 (fração B15 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 12. Espectro de massas da fração purificada FR12.



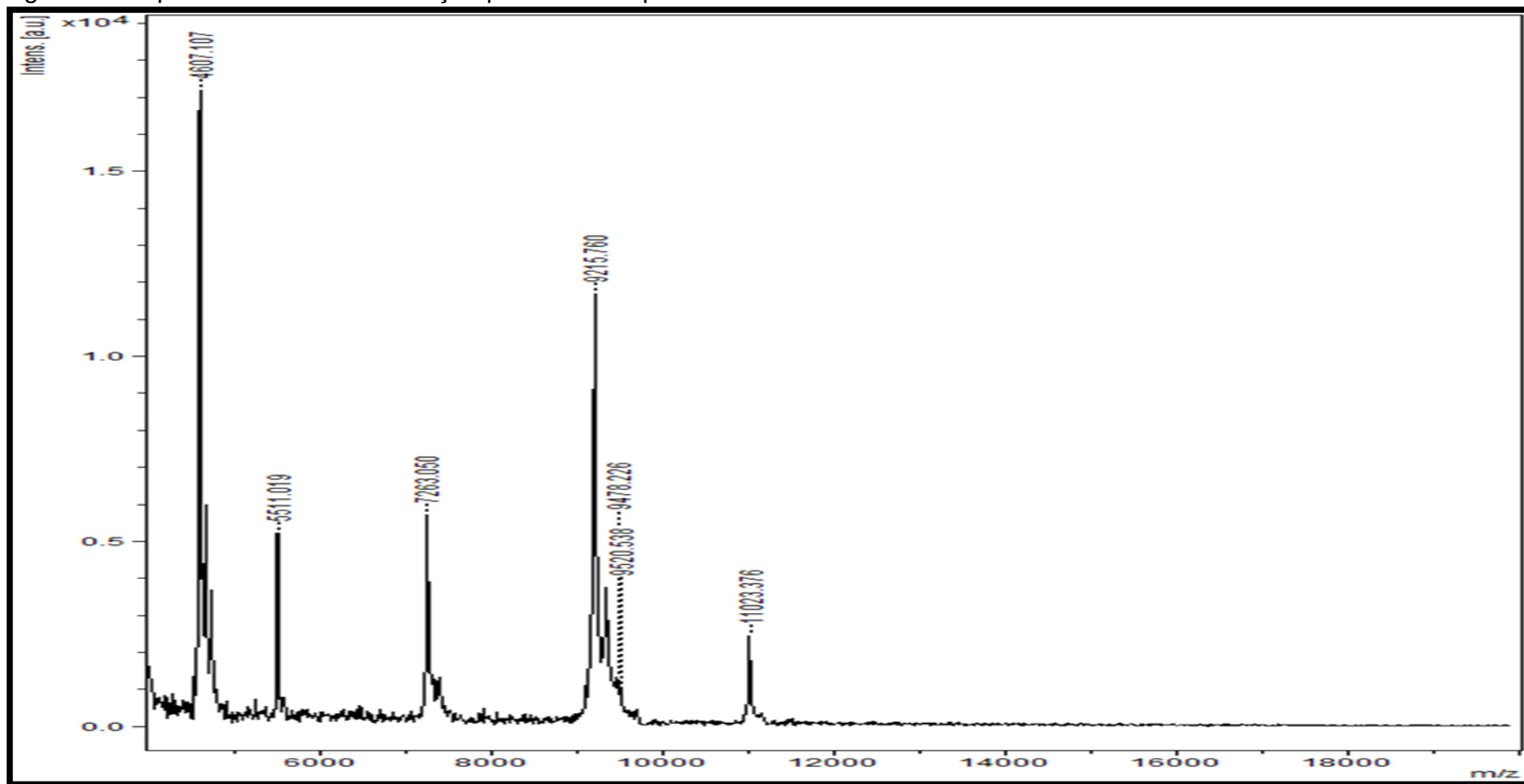
Espectro de massas da amostra FR12: massas moleculares 4606,3; 9212,0 Da. [origem: fração 36 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – FR2 (fração B15 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/GF1 (frações 2 a 6 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 13. Espectro de massas da fração purificada FR13.



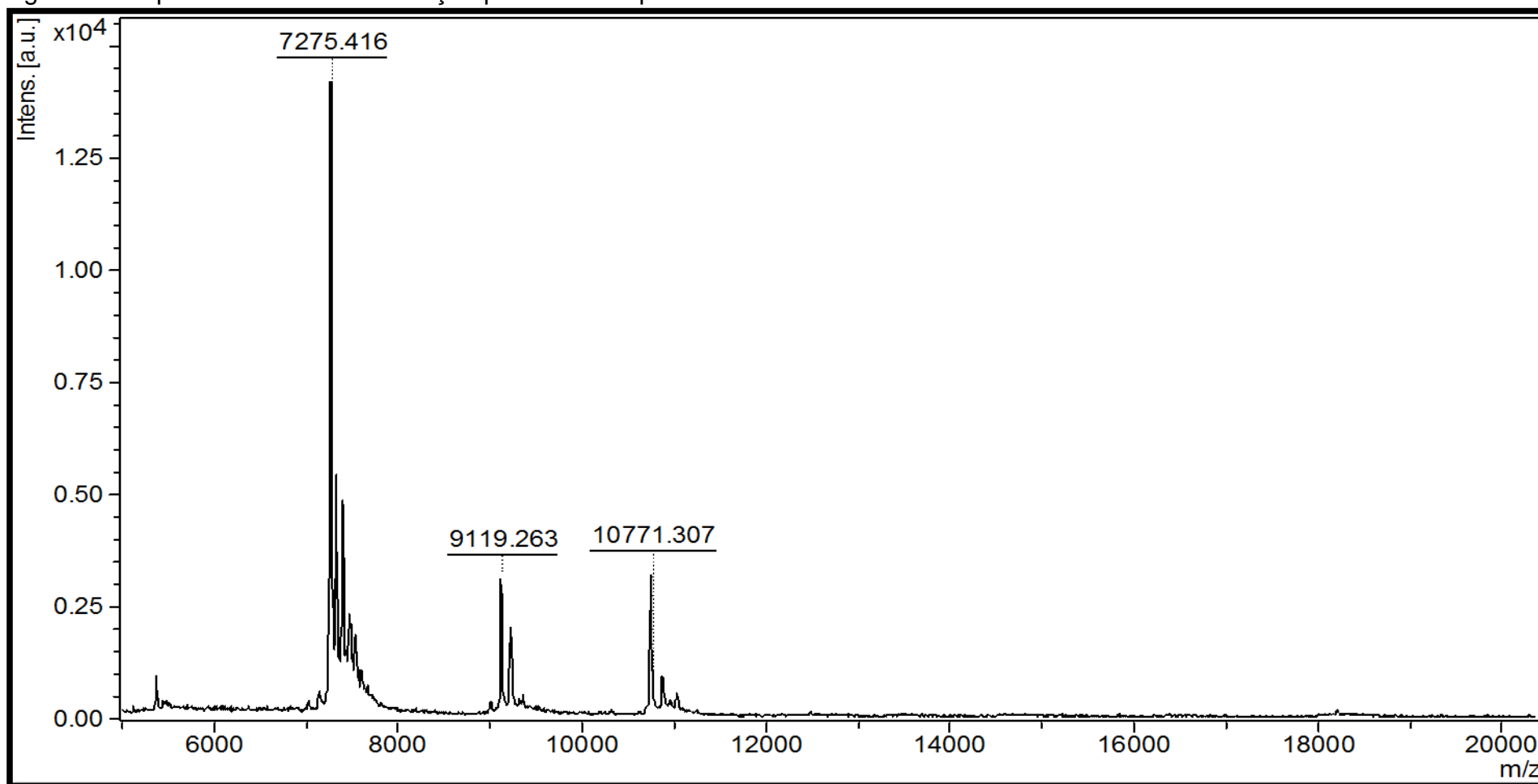
Espectro de massas da amostra FR13: massas moleculares 5369,1 e 10.741,6 Da. [origem: fração 34 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool*/FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 14. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR14.



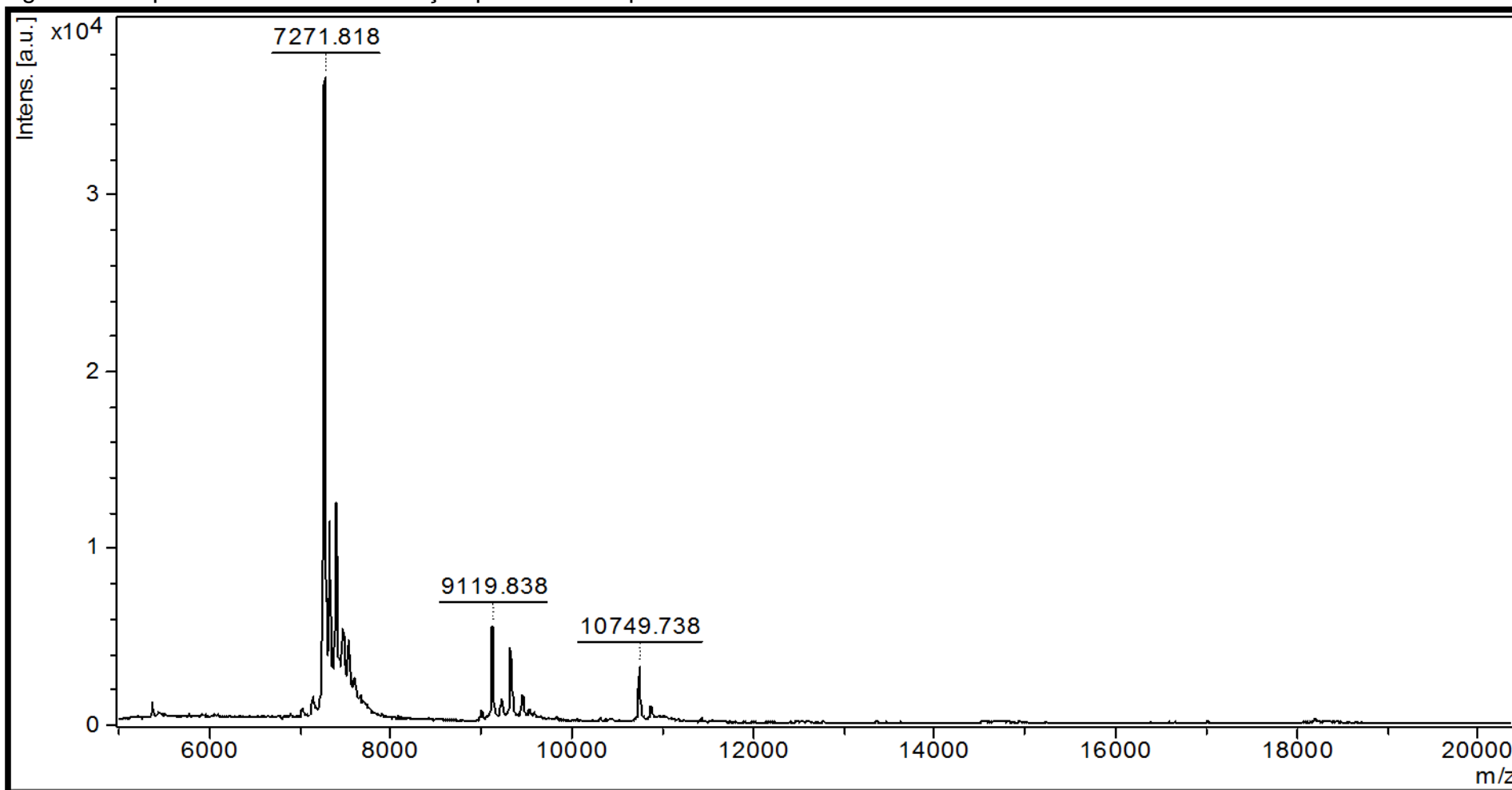
Espectro de massas da amostra FR14: massas moleculares 4607,1 ; 5511,0 ; 7263,0; 9215,7; 11023,3 Da. [origem: fração 35 da
5 cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool*/FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/GF2
(frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 15. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR15.



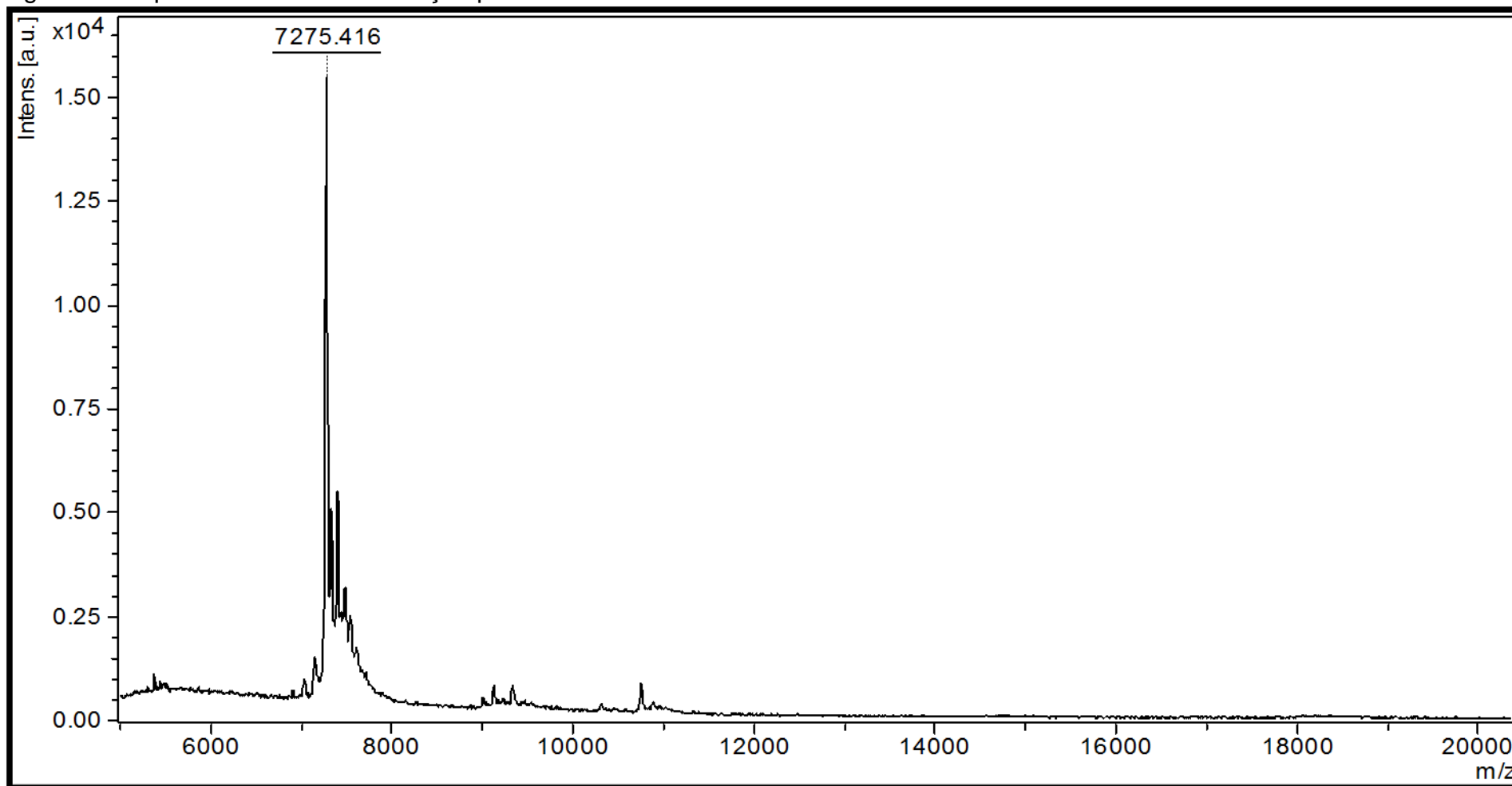
Espectro de massas da amostra FR15: massas moleculares 7275,4 ; 9119,2; 10771,3 Da. [origem: fração 37 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool*/FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 16. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR16.



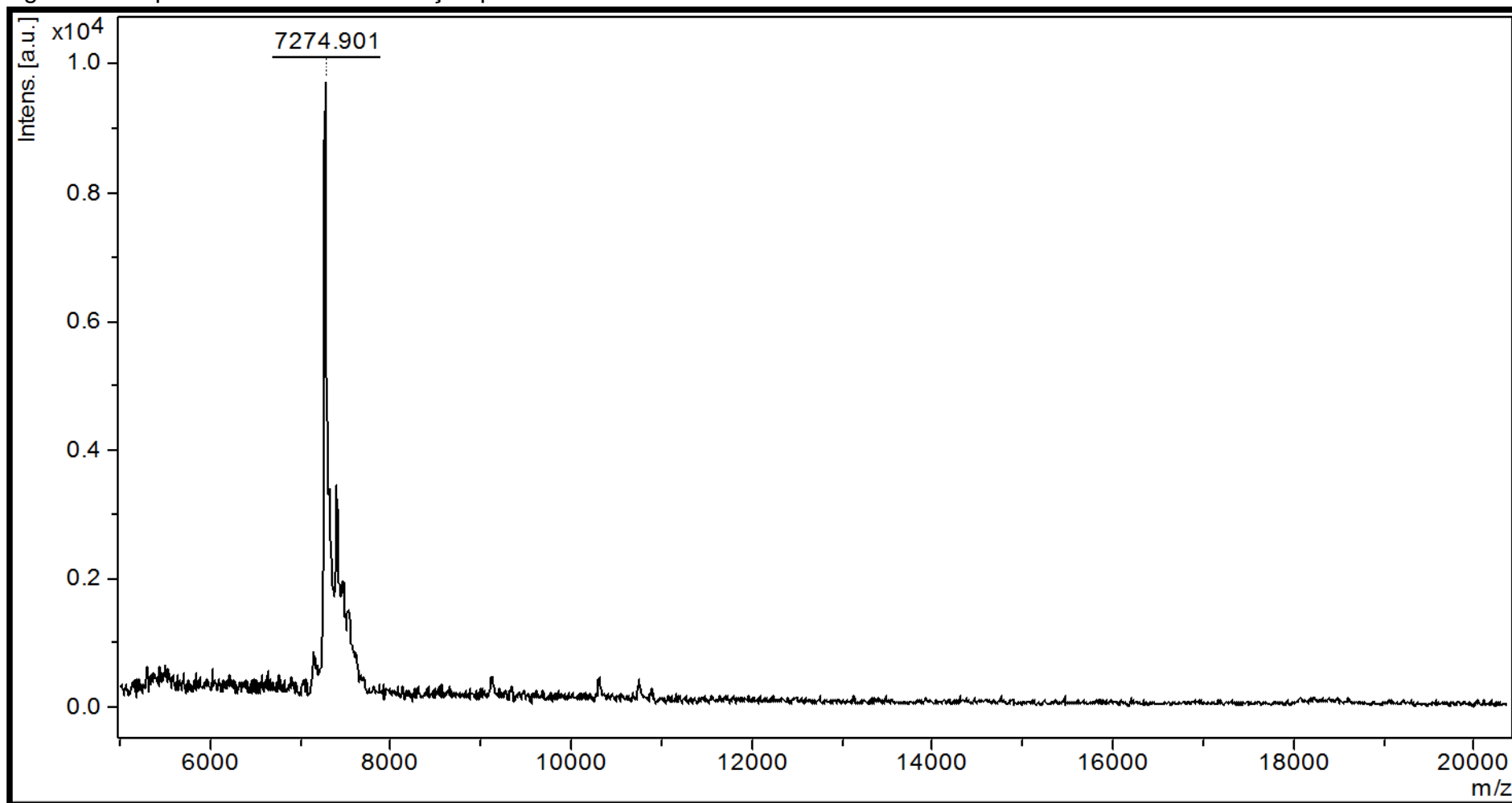
Espectro de massas da amostra FR16: massas moleculares 7271,8; 9119,8 ; 10749,7 Da. [origem: fração 38 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool*/FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool*/GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 17. Espectro de massas da fração purificada FR17.



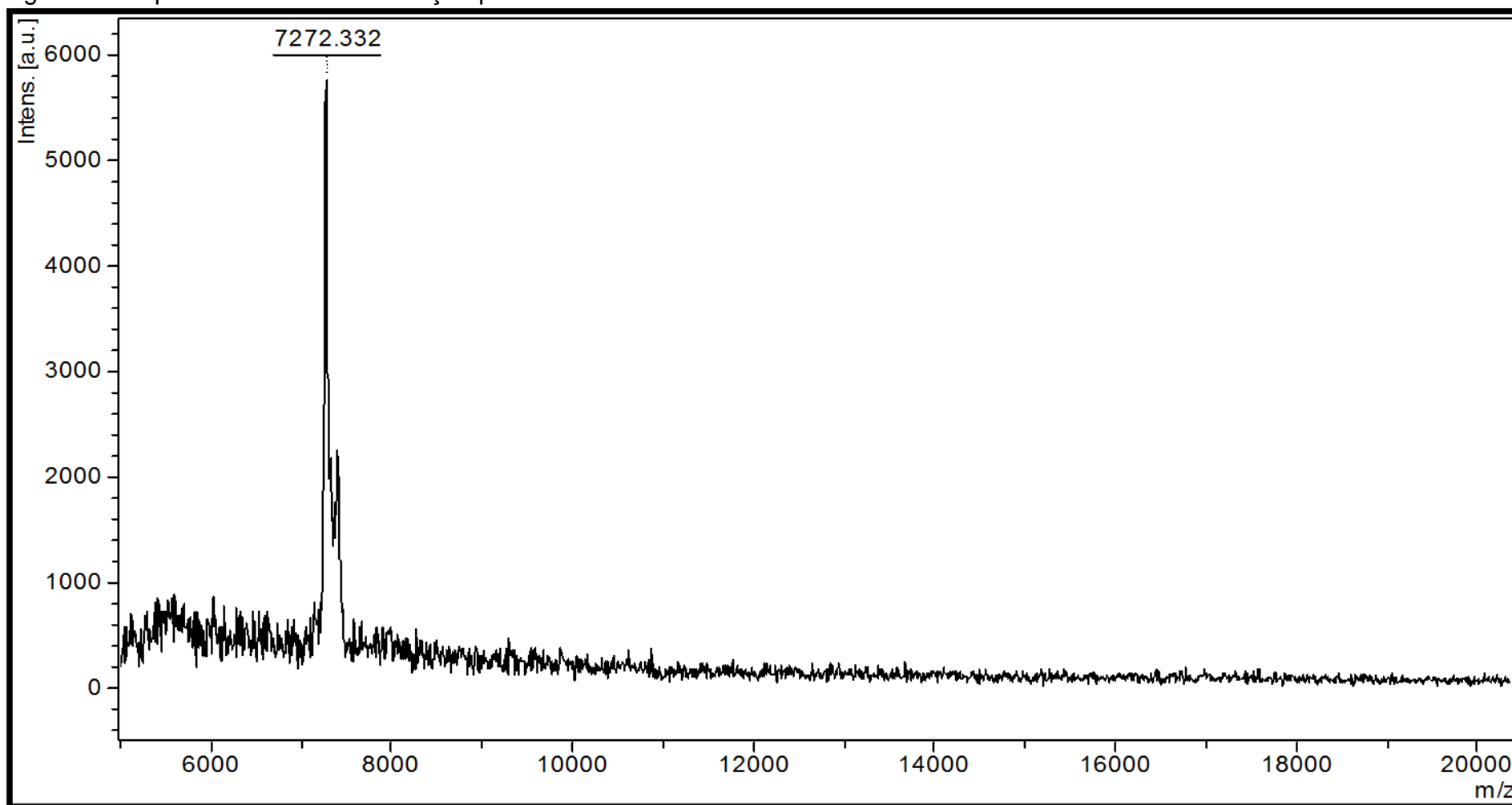
Espectro de massas da amostra FR17: massa molecular 7275,4 Da. [origem: fração 39 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 18. Espectro de massas da fração purificada FR18.



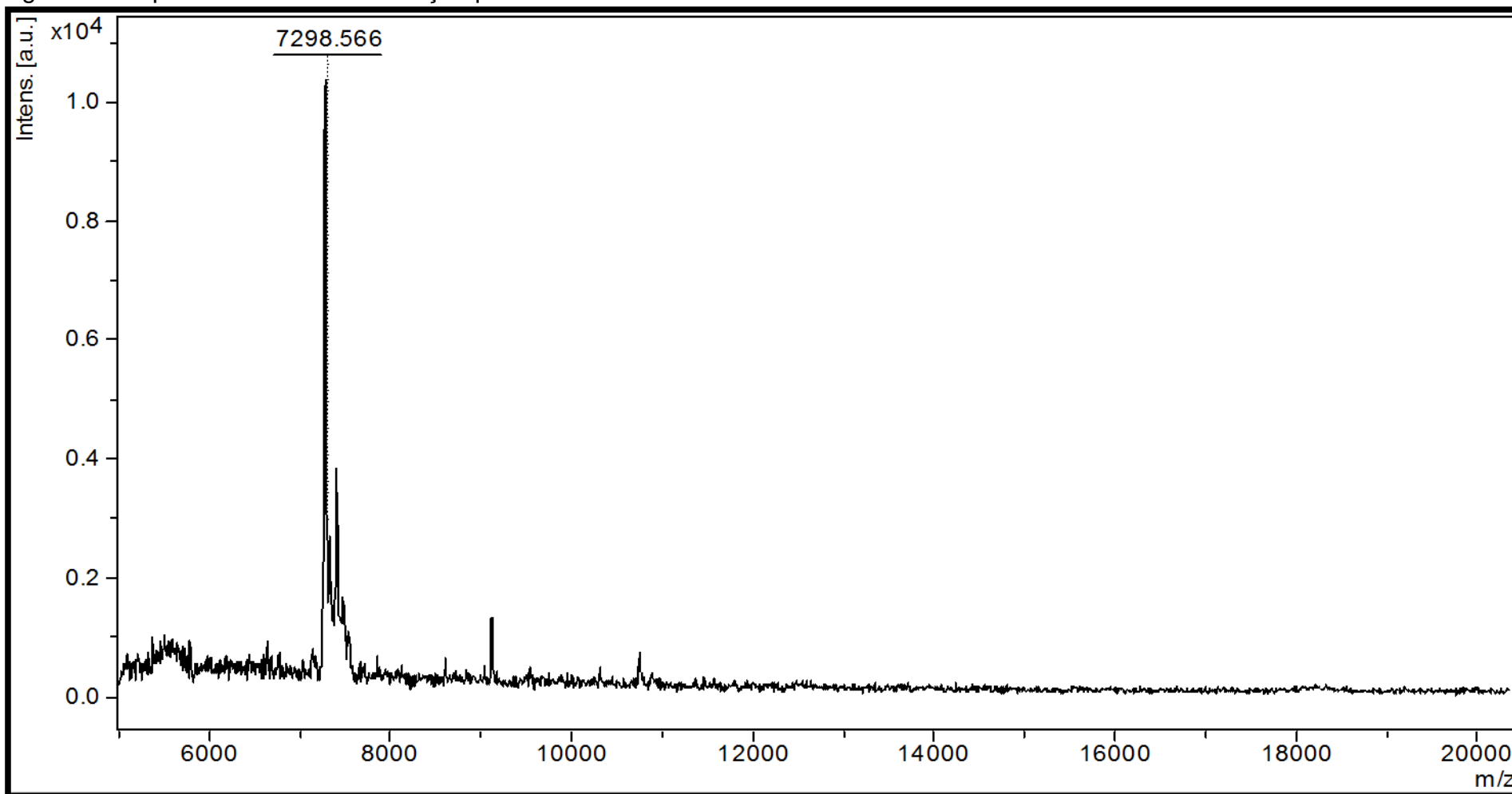
Espectro de massas da amostra FR18: massa molecular 7274,9 Da. [origem: fração 40 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 19. Espectro de massas da fração purificada FR19.



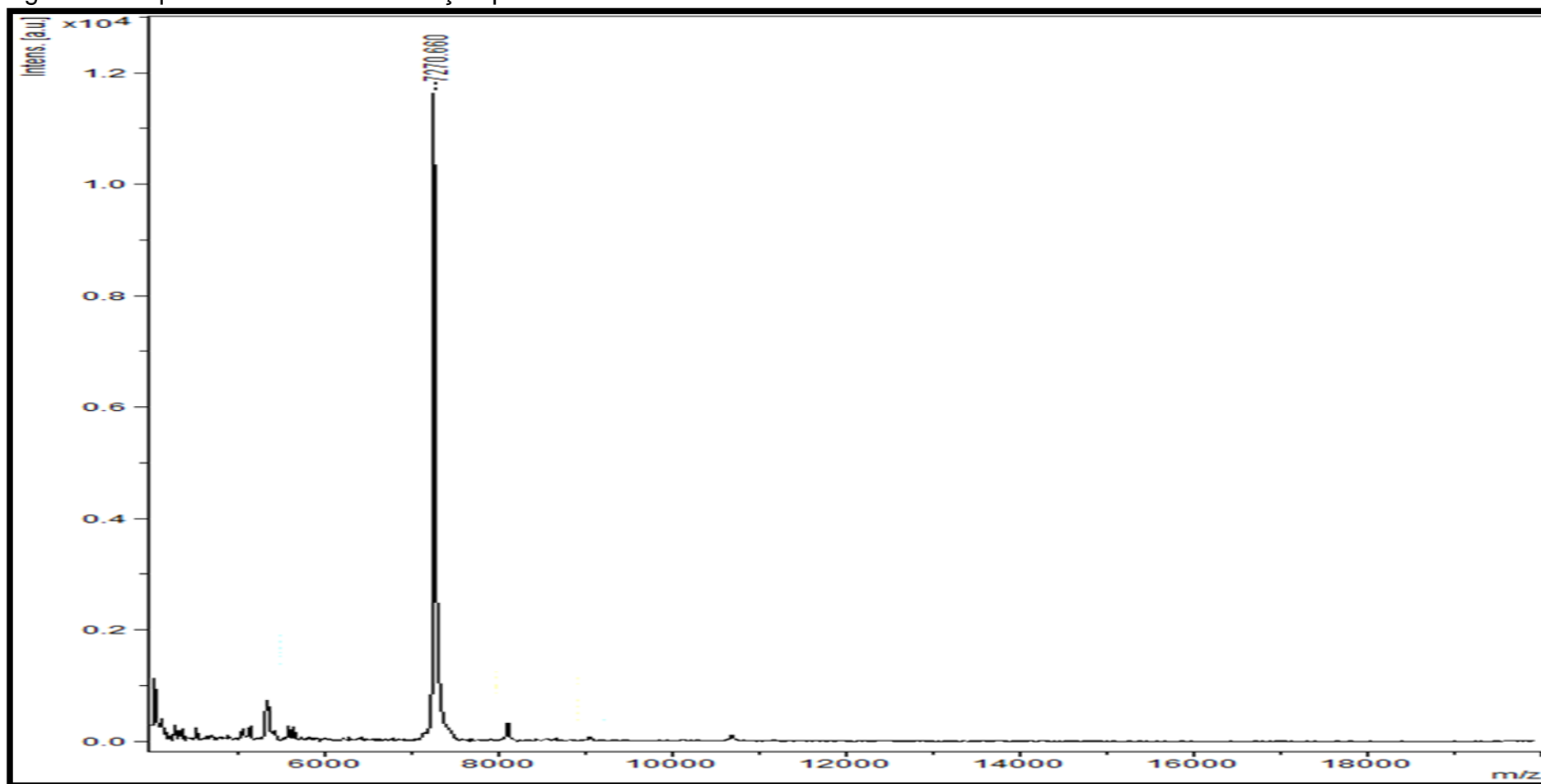
Espectro de massas da amostra FR19: massa molecular 7272,3 Da. [origem: fração 57 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 20. Espectro de massas da fração purificada FR20.



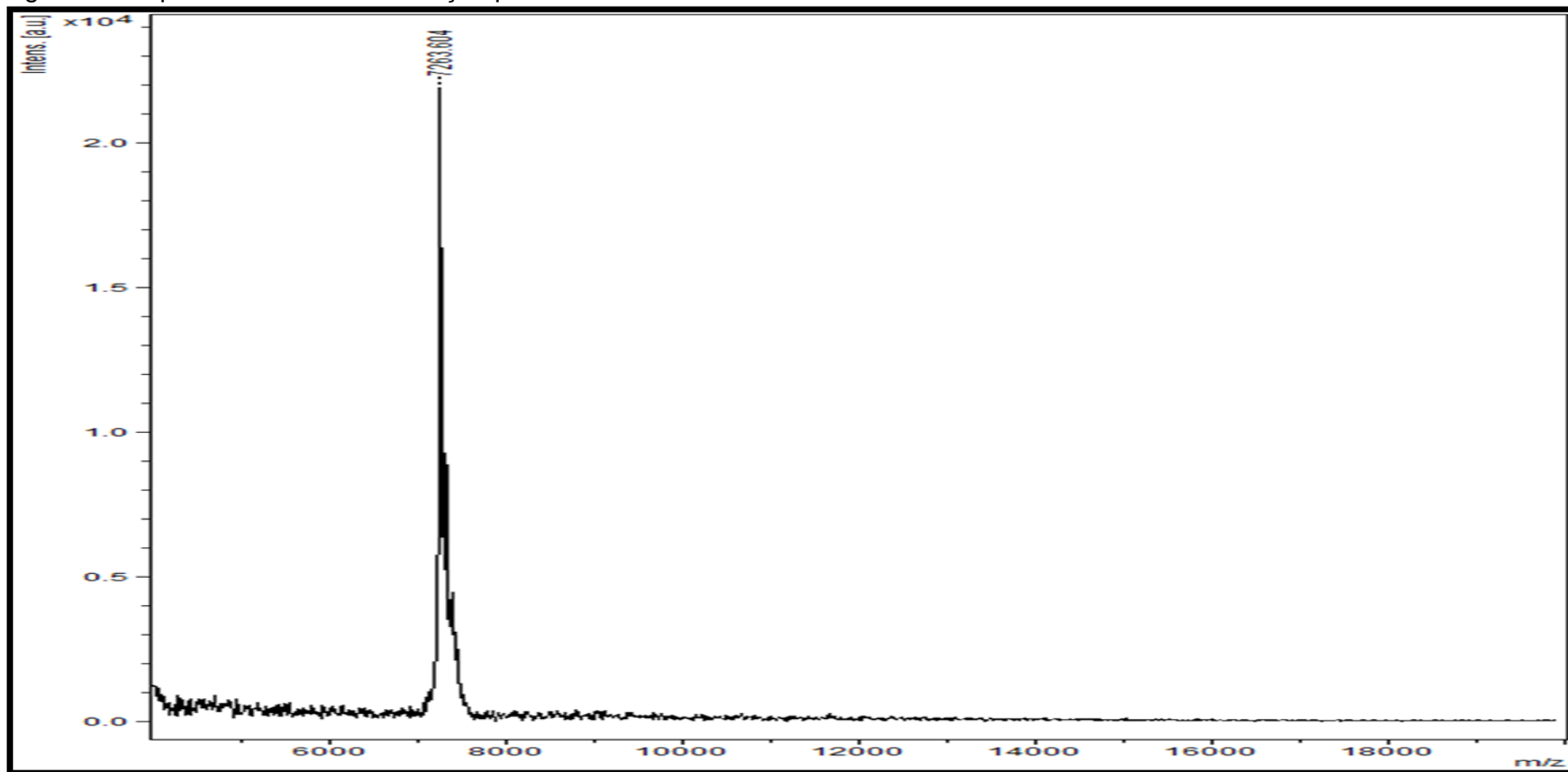
Espectro de massas da amostra FR20: massa molecular 7298,5 Da. [origem: fração 58 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR3 (frações C1 a C3 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 21. Espectro de massas da fração purificada FR21.



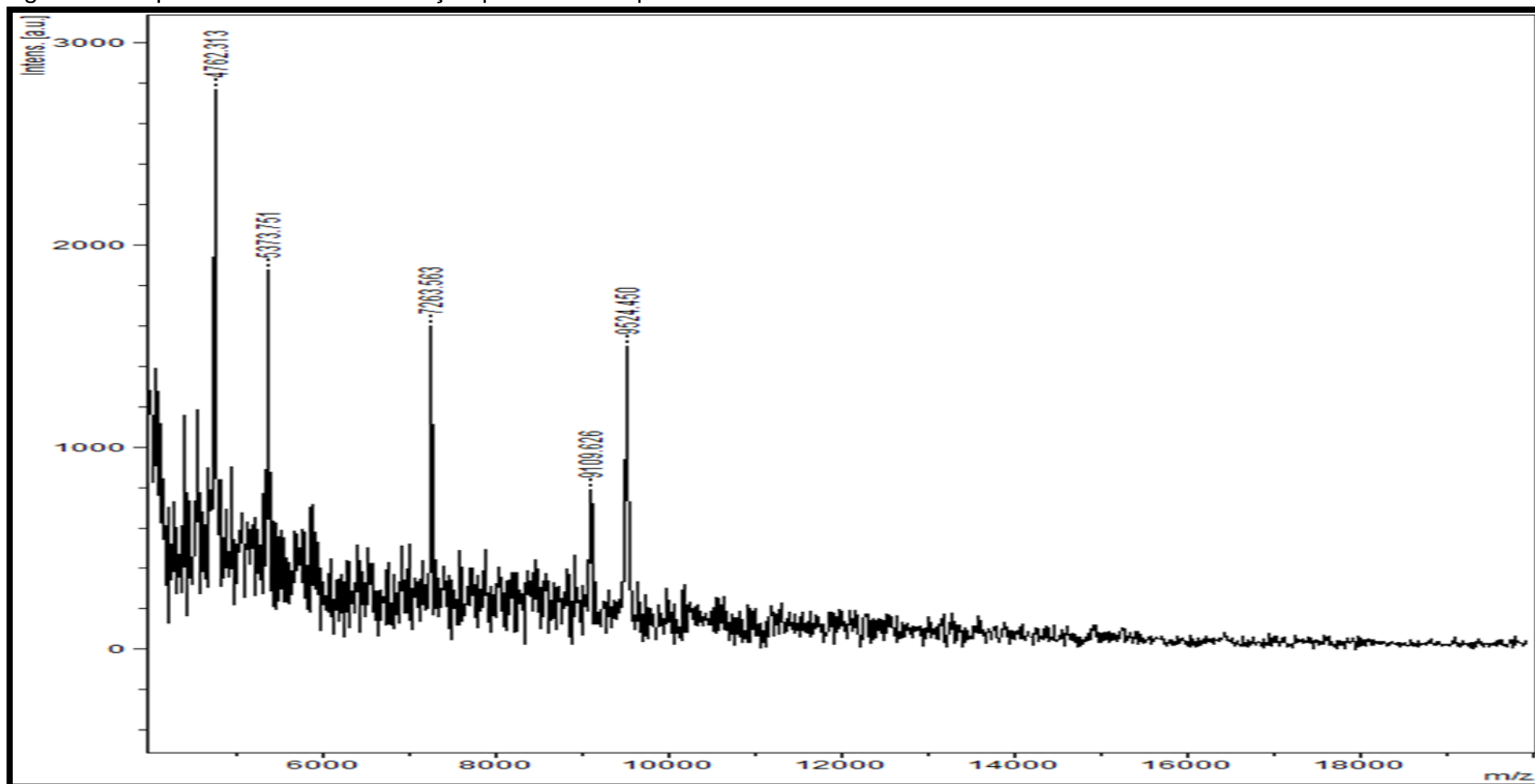
Espectro de massas da amostra FR21: massa molecular 7270,6 Da. [origem: fração 34 da cromatografia de fase reversa Peptide
5 C18 – *pool* FR4 (frações C4 a C10 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de
exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 22. Espectro de massas da fração purificada FR22.



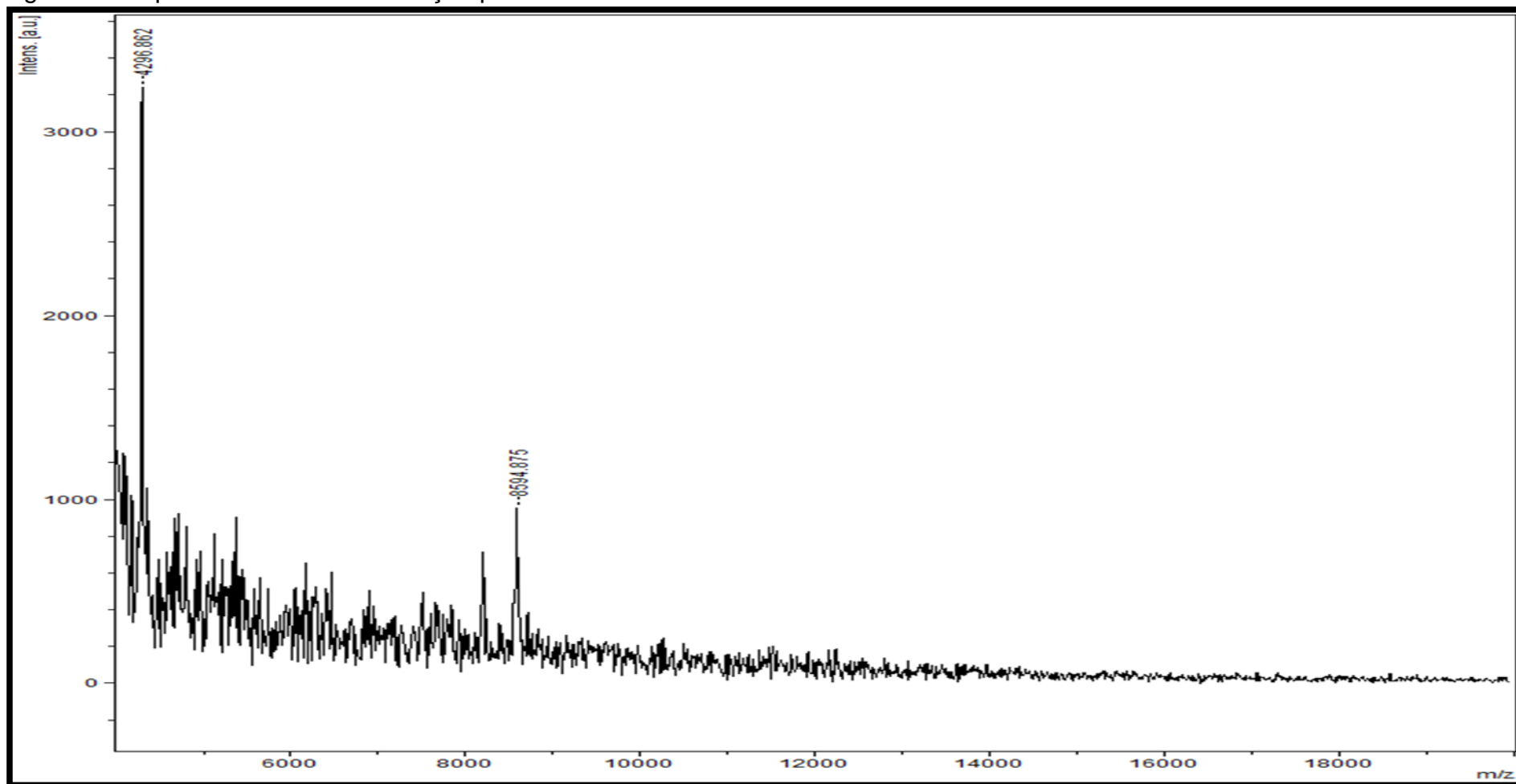
- 5 Espectro de massas da amostra FR22: massa molecular 7263,6 Da. [origem: fração 36 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR4 (frações C4 a C10 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2 (frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 23. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR23.



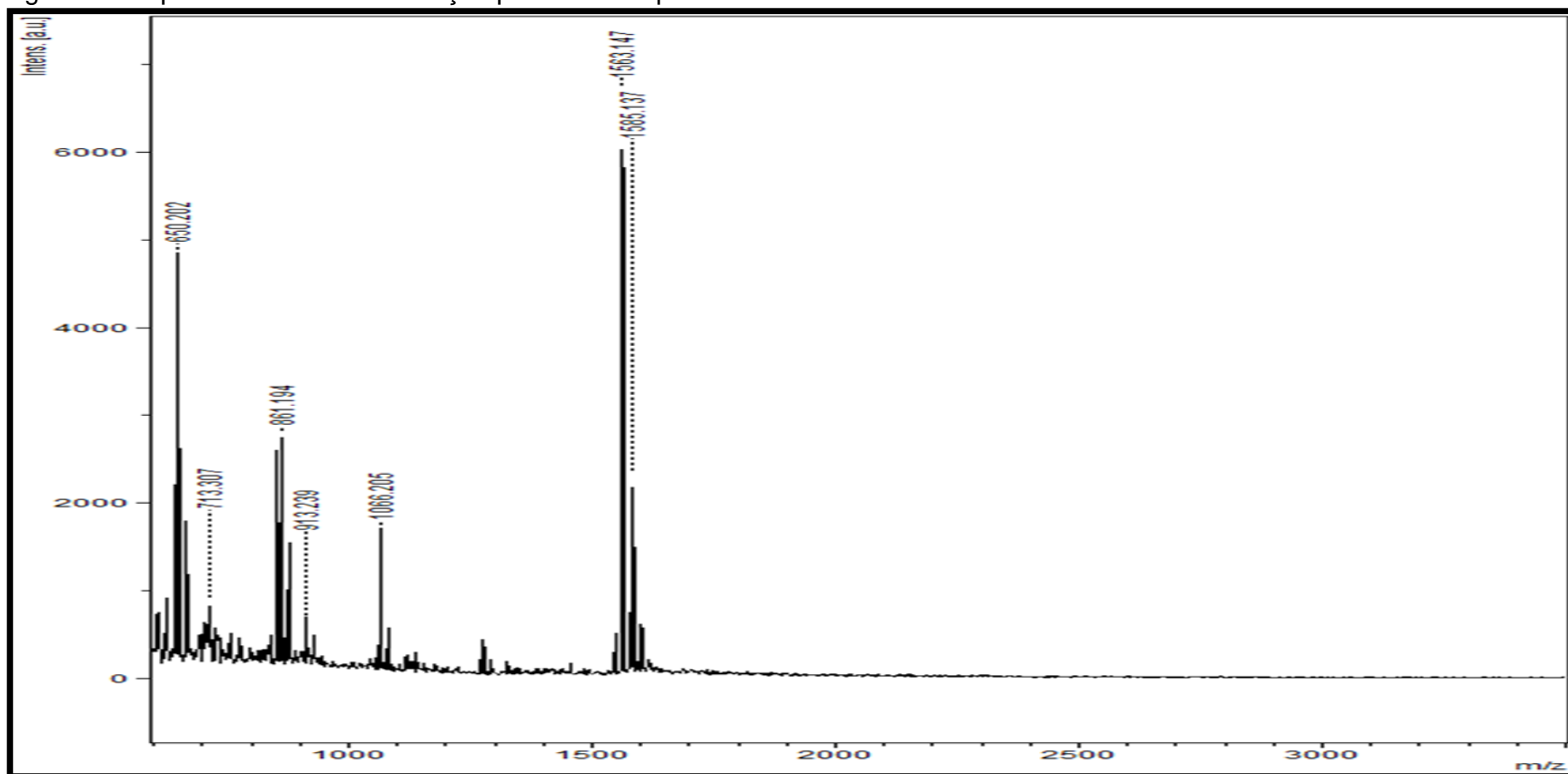
Espectro de massas da amostra FR23: massas moleculares 4762,3; 5373,7; 7263,5; 9109,6; 9524,4 Da. [origem: fração 37 da
5 cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR4 (frações C4 a C10 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - *pool* GF2
(frações 7 a 9 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 24. Espectro de massas da fração purificada FR24.



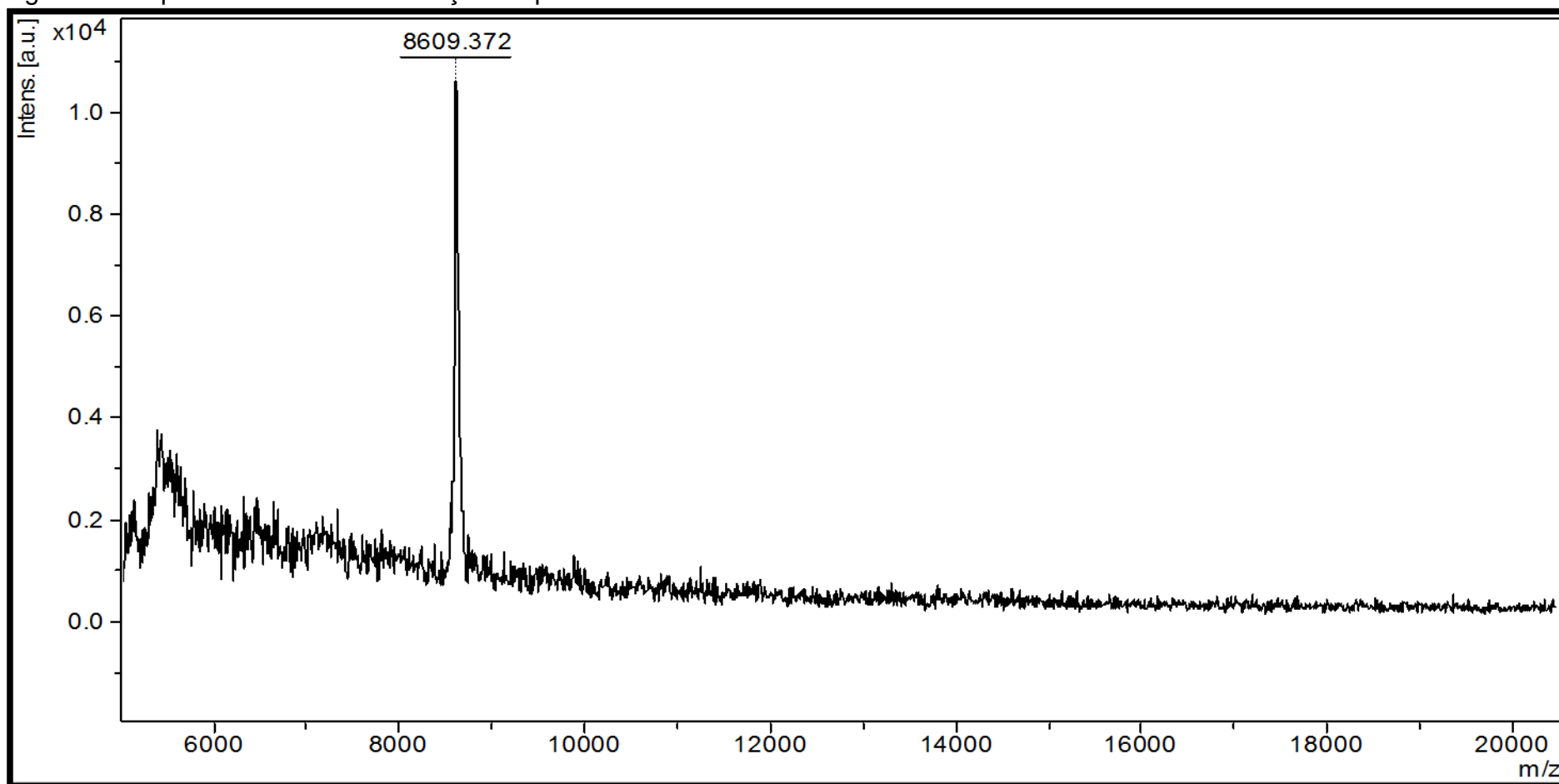
Espectro de massas da amostra FR24: massas moleculares 4296,8; 8594,8 Da. [origem: fração 35 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool*/ FR6 (frações C1 e C2 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - GF4 (fração 11 da cromatografia de exclusão molecular - *pool*/ T1 (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 25. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR25.



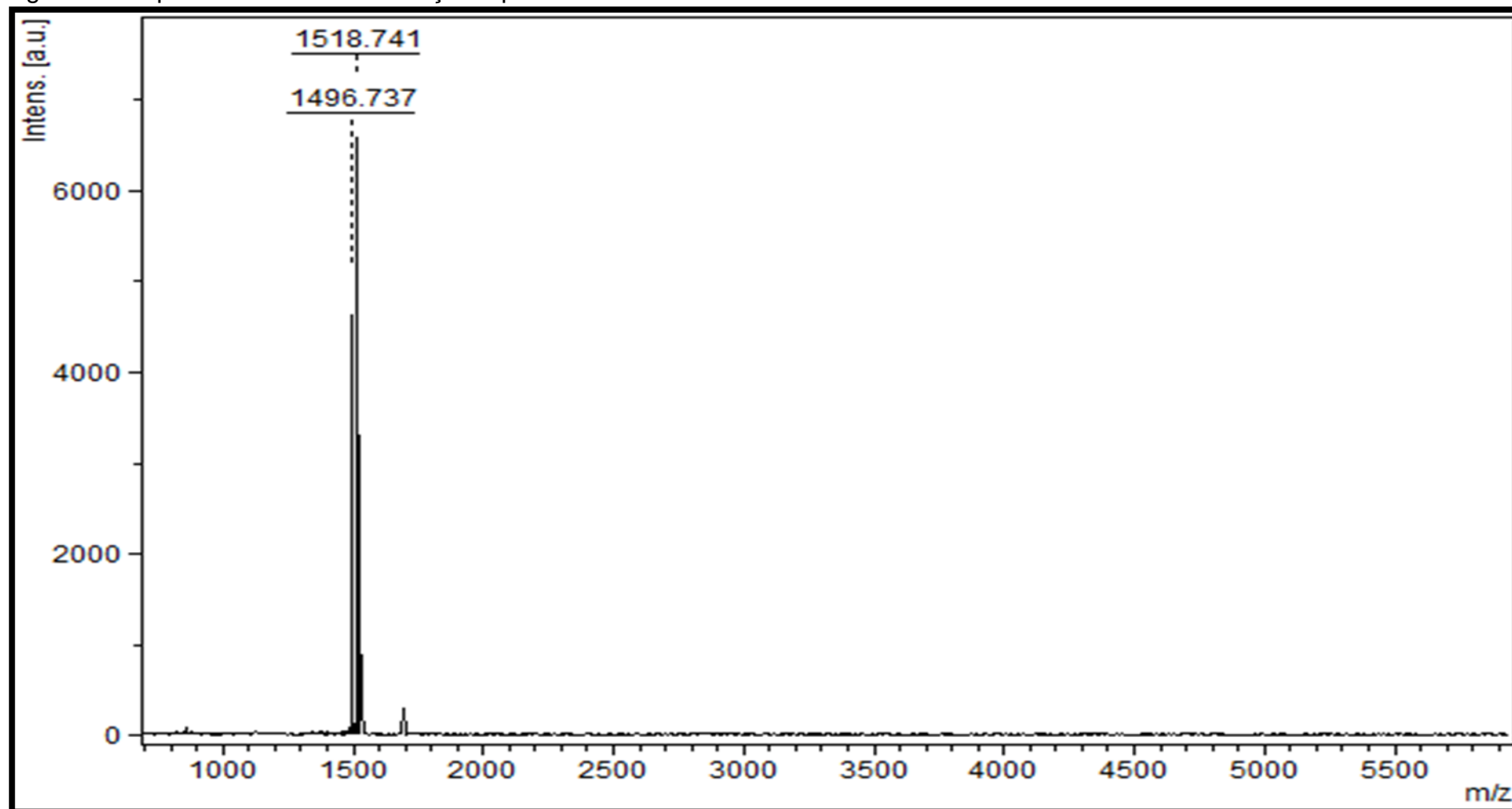
Espectro de massas da amostra FR25: massas moleculares 650,2; 713,3; 861,1; 913,2; 1066,2; 1563,1 Da. [origem: fração 37 da
5 cromatografia de fase reversa Peptide C18 – *pool* FR6 (frações C1 e C2 da cromatografia de fase reversa Supelco C-8) - GF4
(fração 11 da cromatografia de exclusão molecular - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

Figura 26. Espectro de massas da fração 12 purificada.



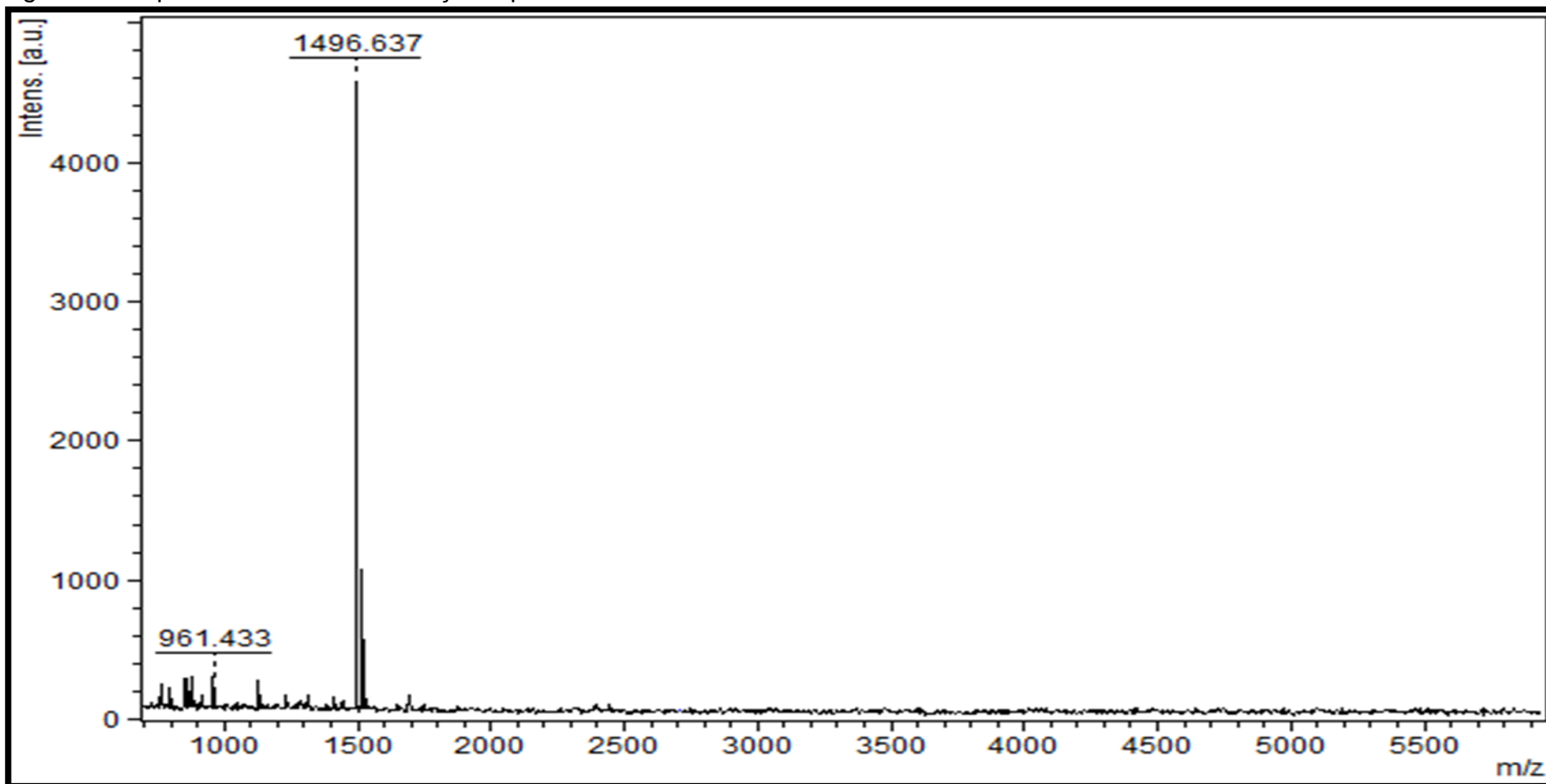
Espectro de massas da fração 12 : massa molecular 8609,3 Da. [origem: fração 12 da cromatografia de troca iônica – *pool*/ AF 3 (frações 20 a 25 da cromatografia de afinidade)].

Figura 27. Espectro de massas da fração 6 purificada.



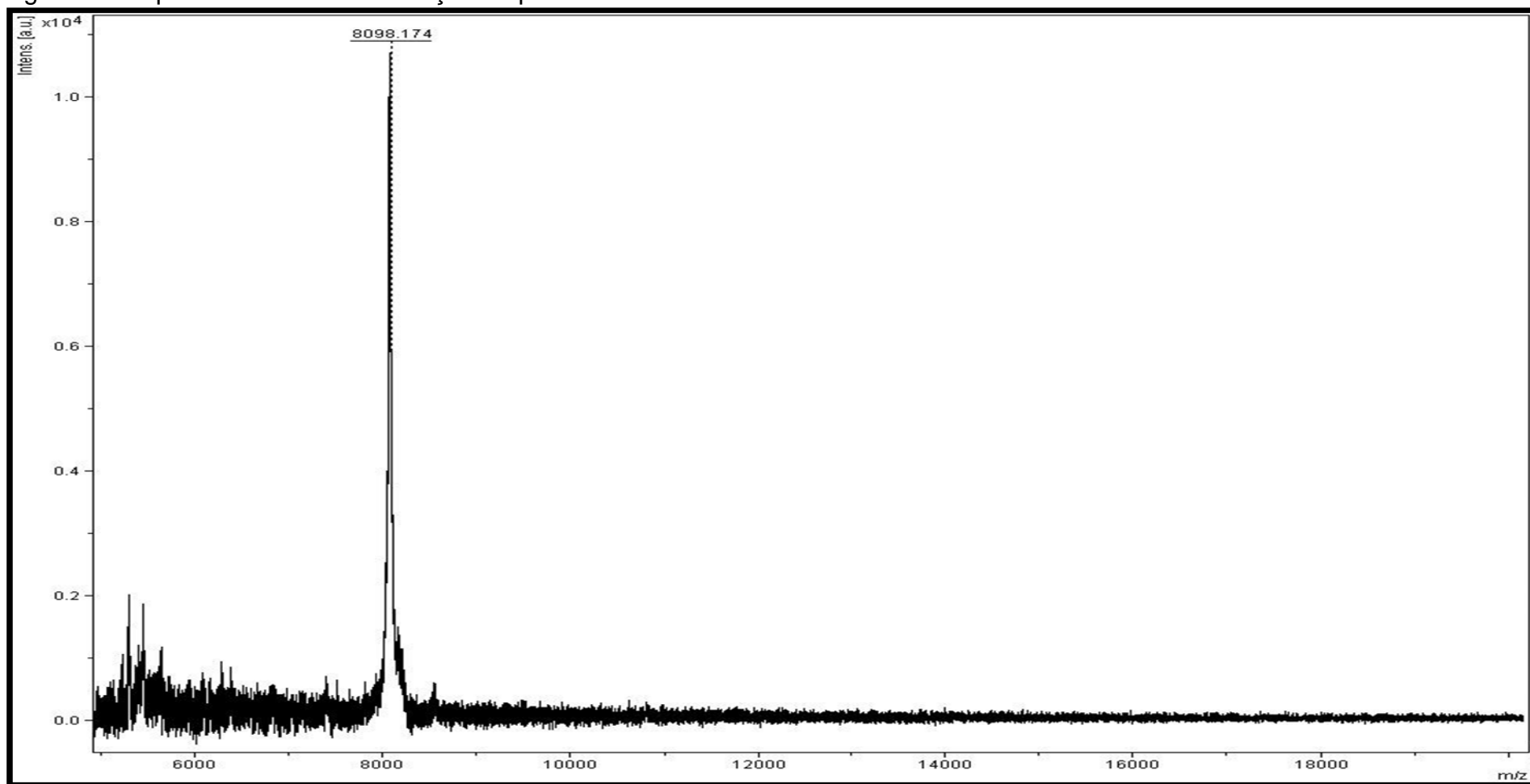
Espectro de massas da fração 6 : massas moleculares 1496,7 e 1518,7 Da. [origem: fração 6 da cromatografia de troca iônica – pool AF 4 (frações 26 a 30 da cromatografia de afinidade)].

Figura 28. Espectro de massas da fração 8 purificada.



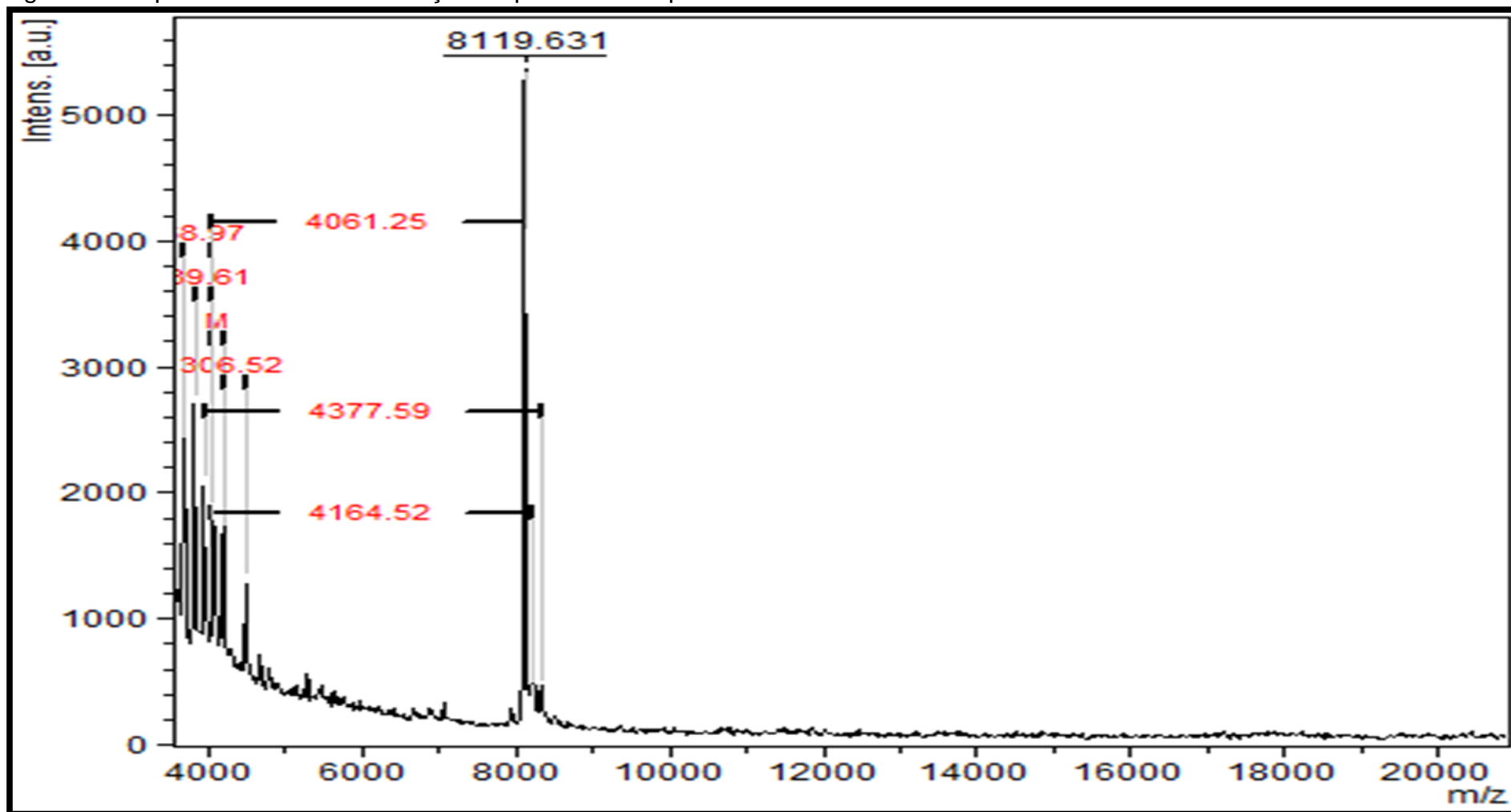
- 5 Espectro de massas da fração 8 : massas moleculares 961,4 e 1496,6 Da. [origem: fração 8 da cromatografia de troca iônica – *pool* AF 4 (frações 26 a 30 da cromatografia de afinidade)].

Figura 29. Espectro de massas da fração 11 purificada.



Espectro de massa da fração 11: massa molecular 8098,1 Da. [origem: fração 11 da cromatografia de troca iônica – *pool* AF 4 (frações 26 a 30 da cromatografia de afinidade)].

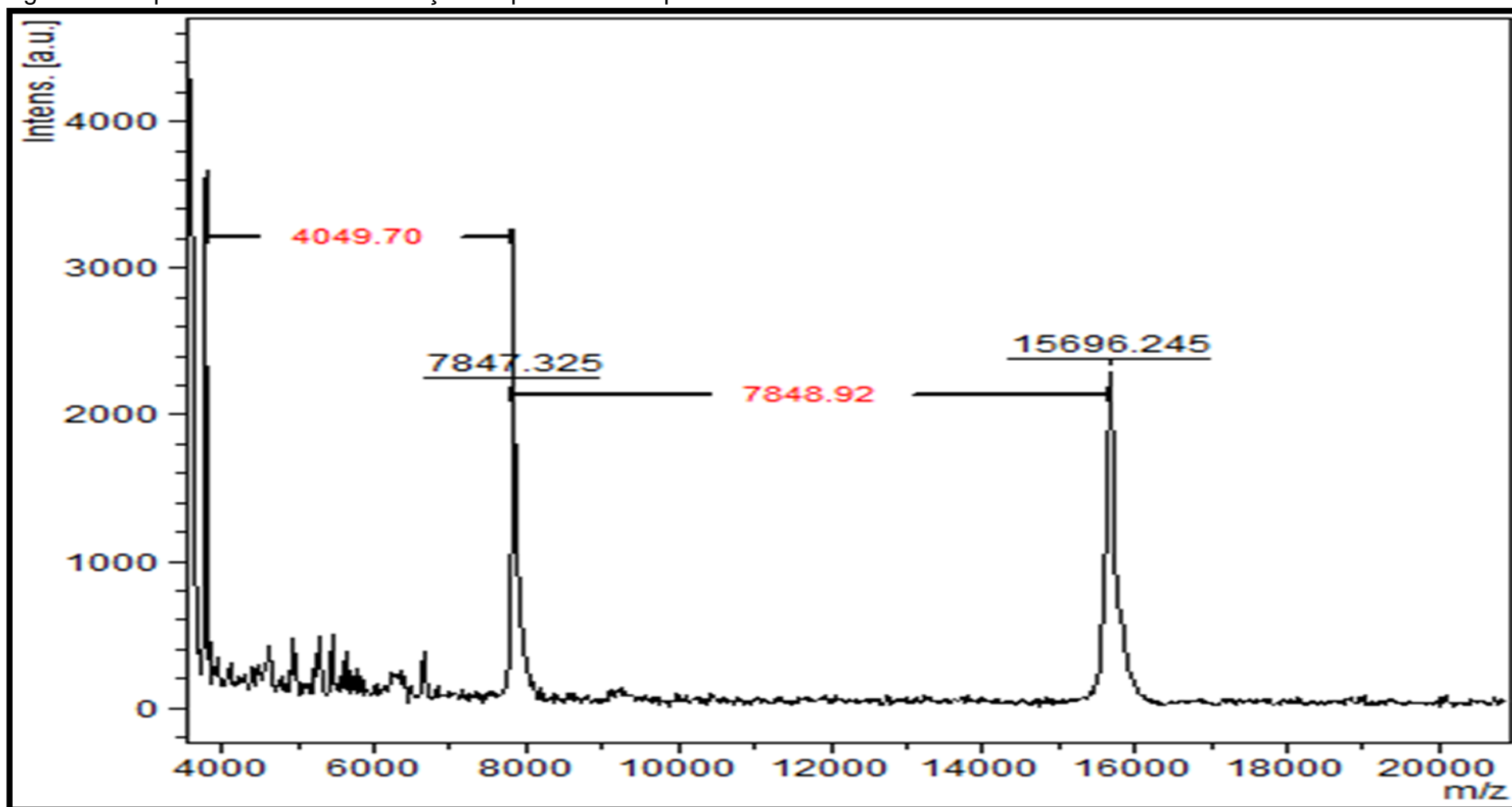
Figura 30. Espectro de massas da fração 14 parcialmente purificada.



Espectro de massas da fração 14: massas moleculares 4041,2; 4164, 5, 4377,5 e 8119,6 Da. [origem: fração 14 da cromatografia de troca iônica – *pool* AF 4 (frações 26 a 30 da cromatografia de afinidade)].

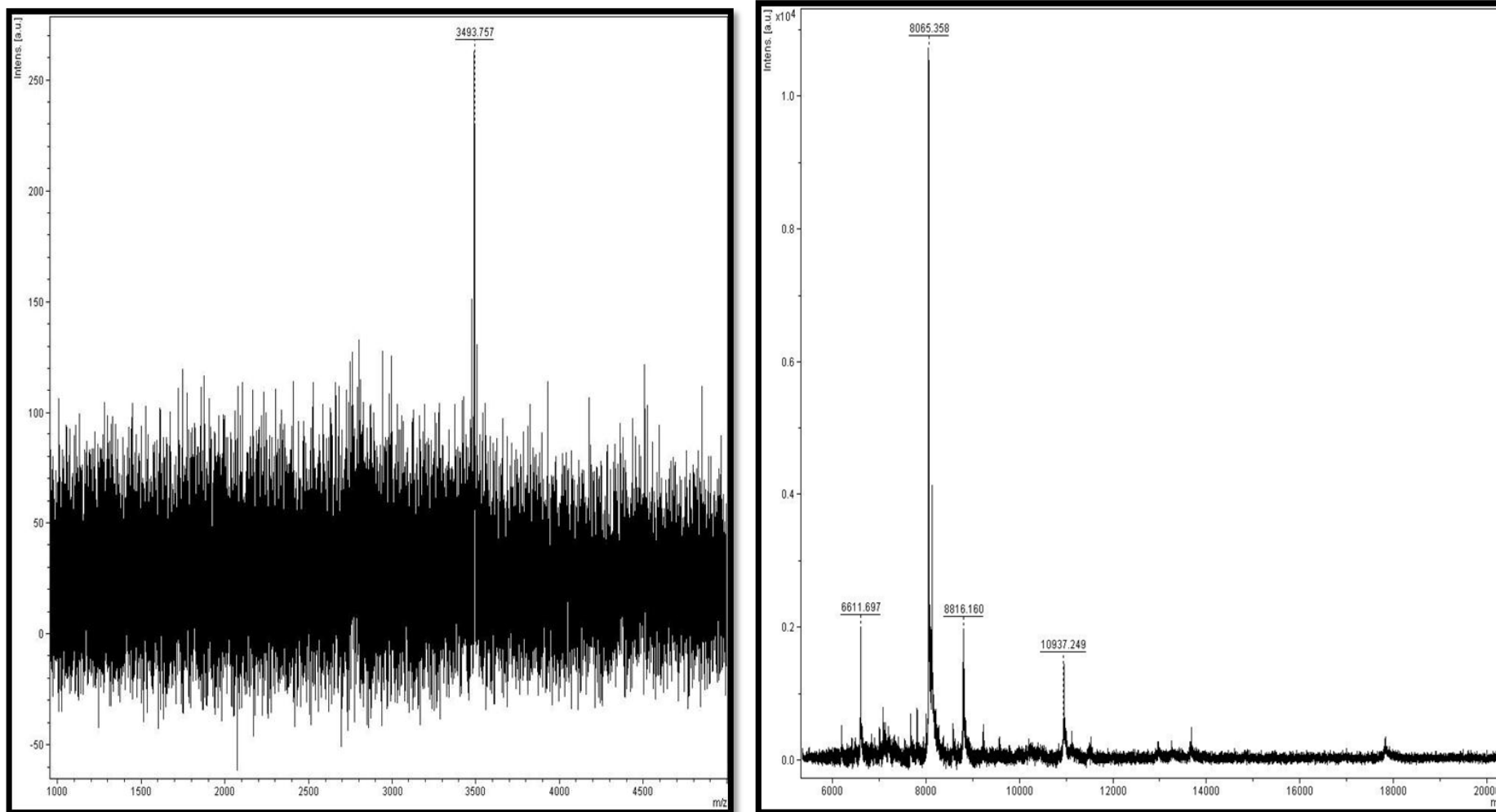
5

Figura 31. Espectro de massas da fração 18 parcialmente purificada.



Espectro de massas da fração 18: massas moleculares 4049,7; 7847,3 e 15.696,2 Da. [origem: fração 18 da cromatografia de troca iônica – *pool* AF 4 (frações 26 a 30 da cromatografia de afinidade)].

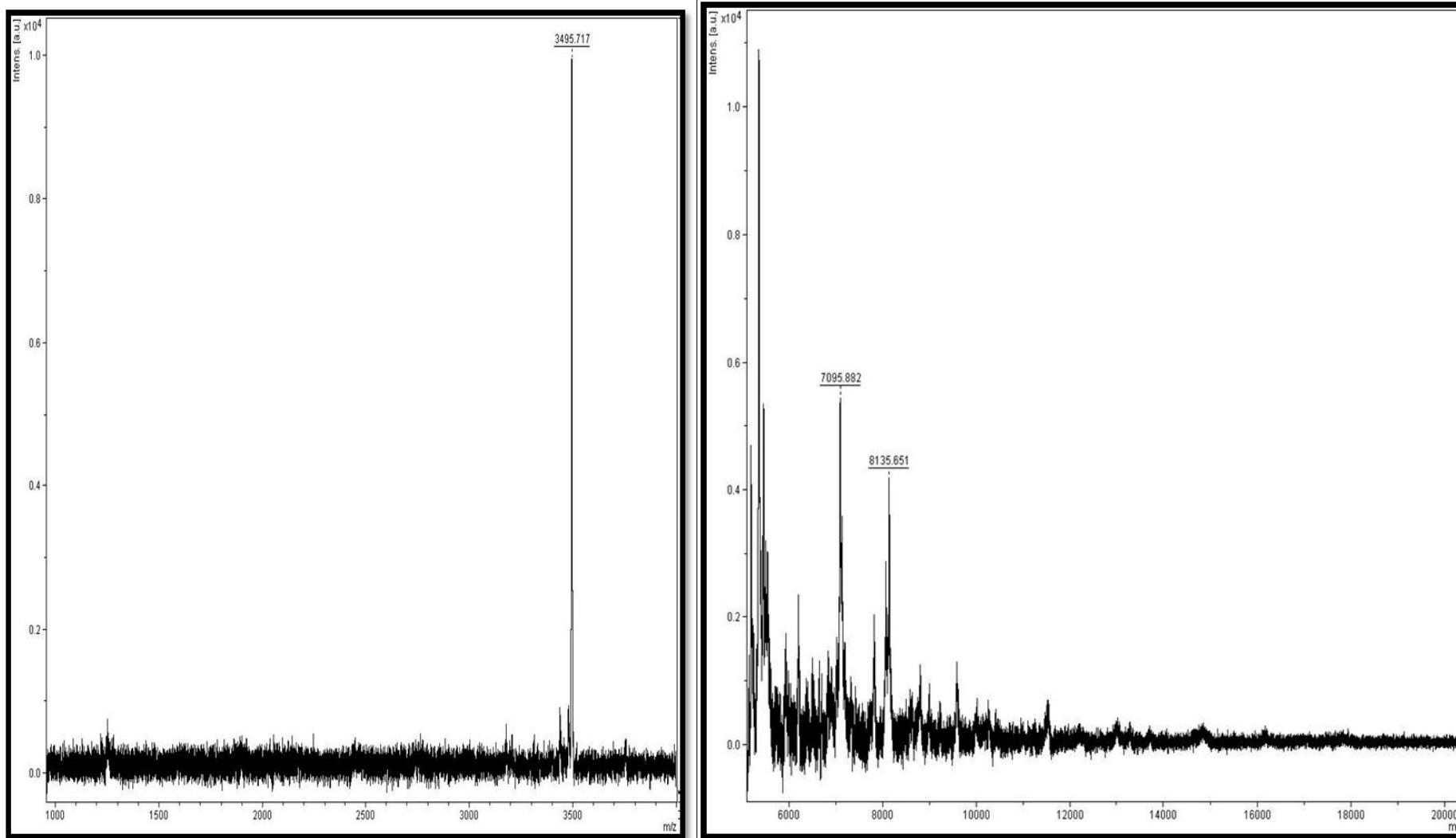
Figura 32. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR32.



Espectro de massas da amostra FR32: massa molecular 3493,7; 6611,6; 8065,3; 8816,1; 19937,2 Da. [origem: fração 35 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – SS12 utilizada como matriz de afinidade.]

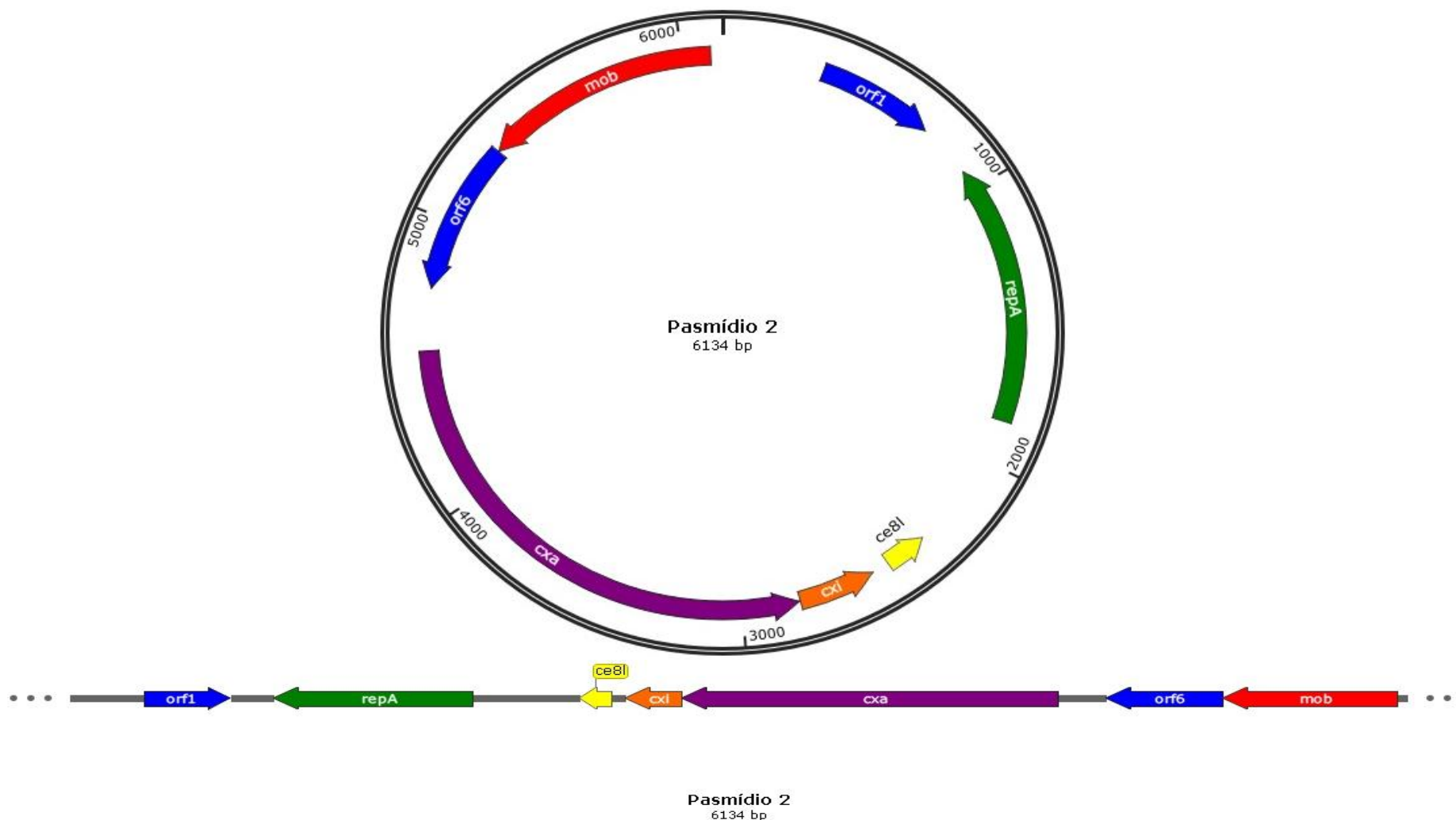
5

Figura 33. Espectro de massas da fração parcialmente purificada FR33.



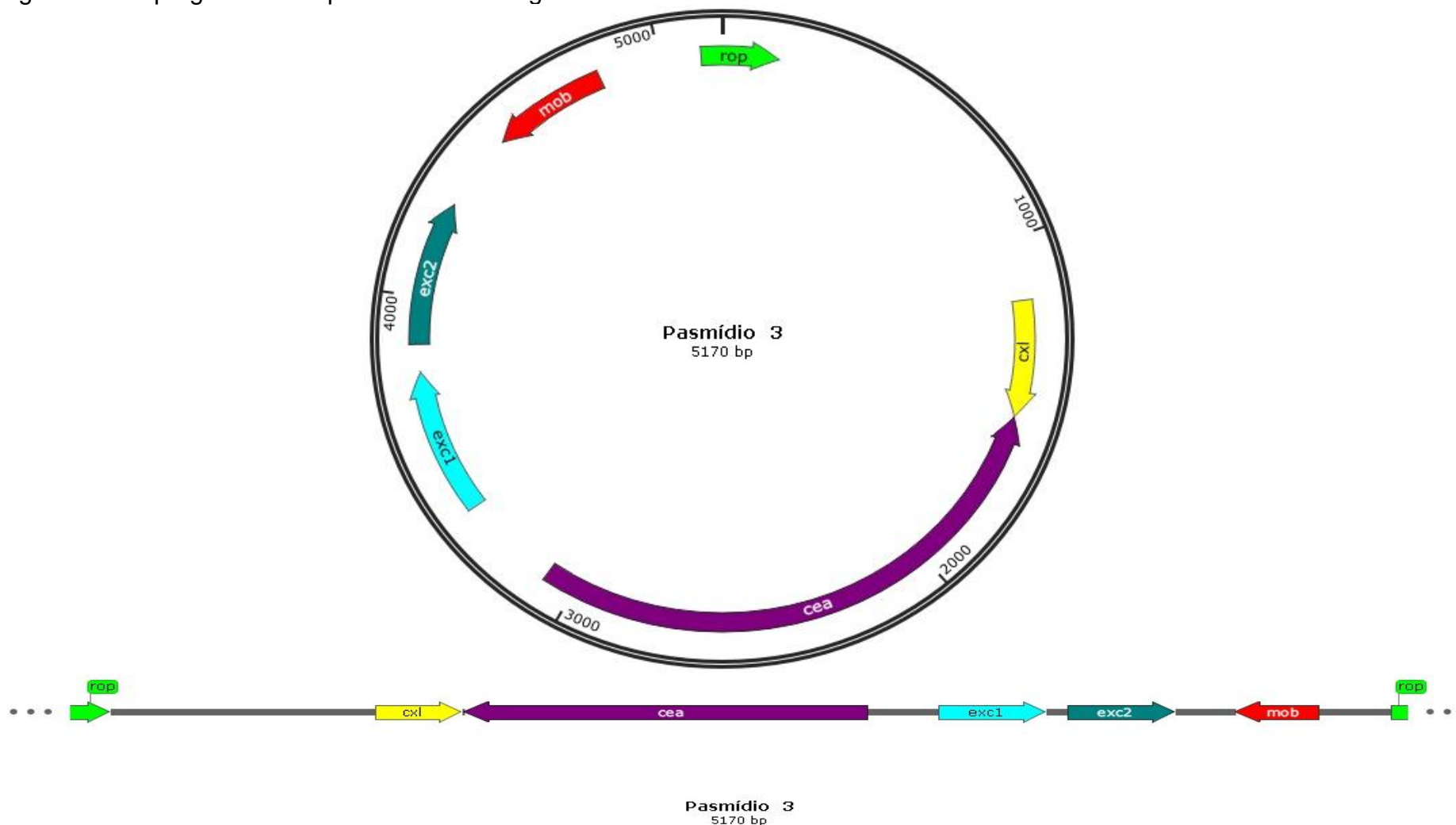
- 5 Espectro de massas da amostra FR 33: massa molecular 3495,7; 7095,8; 8135,6 Da. [origem: fração 36 da cromatografia de fase reversa Peptide C18 – SS12 utilizada como matriz de afinidade.

Figura 34. Mapa genético do plasmídeo colicinogênico 2.



5 Sequenciamento de nova geração em plataforma *illumina Miseq* e análise da sequência em banco de dados *Genbank* do plasmídeo colicinogênico 2, 6.134pb, extraído da amostra produtora de substância antagonista *S. sonnei* SS9. O plasmídeo analisado possui 7 ORFs e dentre essas três, *ce8I*, *cxi* e *cxa*, referentes ao operon colicinogênico.

Figura 35. Mapa genético do plasmídeo colicinogênico 3.



5 Sequenciamento de nova geração em plataforma *illumina Miseq* e análise da sequência em banco de dados *Genbank* do plasmídeo colicinogênico 3, 5.170 pb, extraído da amostra produtora de substância antagonista *S. sonnei* SS9. O plasmídeo analisado possui 6 ORFs e dentre essas duas, *cxi* e *cea*, referentes ao operon colicinogênico.

5

10

15

20

25

30

APÊNCIDE II

Tabela 1. Análise das ORFs localizadas no *contig* 1, 46.188pb, isolado da amostra produtora de substância antagonista SS9

Gene	Localização no plasmídio	Comprimento (nt/aa)	Massa molecular	Produto	Identidade	Query coverage	Nº de acesso subject	Nº de acesso pfam e cd query
<i>sopa</i>	513-1679	1164/388	43,6	Proteína de divisão de plasmídio (<i>S. sonnei</i>)	100%	99%	WP_052968579.1	pfam01656
<i>orf2</i>	1679-2644	963/321	35,7	Proteína de divisão de plasmídio – ParB/RepB/Spo0j/ (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_112384465.1	prk13698
<i>orf3</i>	2677-3252	573/191	21,19	Proteína de montagem da cauda do fago lambda (<i>S. sonnei</i>)	98%	100%	WP_052968577.1	pfam02413
<i>orf4</i>	3252-6650	3396/1132	167,6	Transportador de ácido graxo de cadeia curta (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077125888.1	pfam08400
<i>orf5</i>	6715-7314	357/119	21,7	Proteína da família Ail/lom (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077125884.1	pfam06316
<i>orf6</i>	7381-10863	3480/1160	127,0	Proteína J específica do hospedeiro (<i>S. sonnei</i>)	98%	100%	WP_052975333.1	pfam12421
<i>orf7</i>	10924-11496	570/190	19,4	Proteína de montagem da cauda do profago (<i>E. coli</i>)	100%	100%	WP_000847626.1	pfam06805
<i>orf8</i>	11493-12092	741/247	23,0	Proteína da cauda do fago (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	WP_077124679.1	pfam00877
<i>orf9</i>	12241-12939	696/232	25,7	Proteína L da cauda menor do fago (<i>S. flexneri</i>)	99%	100%	WP_095758983.1	pfam05100
<i>orf10</i>	12939-13268	330/110	12,5	Proteína M da cauda menor do fago (<i>E. coli</i>)	99%	100%	CAU96933.1	pfam05939
<i>orf11</i>	13265-15826	2559/853	92,3	Proteína da fita média da cauda do fago (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	WP_052981259.1	pfam06791

Apêndice II

orf 12	15819-16253	456/152	16,1	Proteína T de montagem da cauda do fago (<i>E. coli</i>)	100%	100%	WP_032164855.1	pfam06223
orf 13	16235-16657	420/140	15,3	Proteína G da cauda menor do bacteriófago lambda (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_052968583.1	pfam06894
orf 14	16673-17413	768/256	25,9	Proteína da cauda do fago (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077903701.1	pfam16461
orf 15	17421-17816	447/149	14,7	Proteína U da cauda menor (<i>E. coli</i>)	100%	100%	OYC12327.1	pfam06141
orf 16	17813-18391	576/192	21,6	Componente da cauda do profago (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	CST47324.1	pfam06763
orf 17	18403-18756	351/117	12,7	Proteína da cauda do fago (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_063102047.1	pfam05354
orf 18	18768-19163	393/131	13,9	Proteína de empacotamento do DNA de bacteriófago	99%	100%	STI46563.1	pfam14000
orf 19	19205-20230	1050/350	30,1	Proteína do capsídeo de bacteriófago (<i>E. fergusonii</i>)	100%	100%	EGC95682.1	pfam03864
orf 20	20286-20618	336/112	11,5	Proteína do capsídeo de bacteriófago (<i>E. coli</i>)	100%	100%	CAU96661.1	pfam02924
orf 21	20628-21948	1317/439	45,9	Peptidase S49 (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	WP_077124677.1	pfam01343
orf 22	21928-23529	1599/533	59,4	Proteína do capsídeo de bacteriófago (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077137612.1	ne
orf 23	23526-23732	204/68	7,6	Proteína W de ligação cabeça cauda do profago lambda (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_029393491.1	pfam02831
orf 24	23729-25654	1923/641	73,1	Proteína terminasse, da subunidade maior, do fago (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_112384470.1	pfam05876
orf 25	25629-26174	543/181	20,5	Proteína terminasse, da subunidade maior, do fago (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_021533771.1	pfam07471
orf	26314-26539	222/74	8,2	Proteína não	100%	100%	CSO50556.1	ne

Apêndice II

26				caracterizada (<i>S. sonnei</i>)					
orf	26772-27221	347/149	16,9	Proteína hipotética (<i>S. sonnei</i>)	93%	100%	WP_052973403.1	ne	
27									
orf	27345-27695	348/116	12,9	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	92%	100%	STN47024.1	ne	
28									
orf	27643-28206	858/286	21,2	Proteína hipotética (<i>S. sonnei</i>)	100%	97%	WP_052971397.1	ne	
29									
orf	28487-28798	309/103	11,5	Proteína DUF4406	99%	100%	WP_054575912.1	pfam14359	
30									
orf	28840-29307	465/155	16,9	Proteína de lise de bacteriófago (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_113465666.1	pfam03245	
31									
orf32	29304-29801	495/165	18,1	Lisozima (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077108029.1	pfam00959	
orf33	29801-30073	270/90	10,0	Proteína hipotética (<i>S. sonnei</i>)	98%	100%	WP_065553372.1	ne	
32									
orf34	30169-31290	1119/373	42,6	DNA metilase (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	CSH47357.1	pfam01555	
orf35	31514-31741	225/75	8,4	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_001386921.1	ne	
33									
orf36	31755-31976	219 ¹ /73	8,5	Proteína hipotética (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077127658.1	ne	
34									
orf37	32140-32451	309/103	11,8	Sistema toxina-antitoxina tipo II: Toxina RelE/ParR (<i>S. boydii</i>)	95%	100%	WP_046891819.1	pfam05973	
35									
orf	32451-32738	285/95	10,5	Regulador transcricional da família XRE (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_032180352.1	pfam01381	
36									
orf	32782-30000	216/72	7,7	Proteína não caracterizada (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	CTA05160.1	ne	
37									
orf40	33242-33568	324/108	12,6	Proteína hipotética (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_052973362.1	ne	
38									
orf	33584-34258	672/224	25,3	Proteína que contém o domínio DUF 551 (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_114304638.1	prk03918	
39									
orf	34255-34545	288/96	10,9	Proteína da família DUF4752 (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077108031.1	pfam15944	
40									
orf	34545-34964	417/139	15,9	Proteína da família DUF977 (<i>S. flexneri</i>)	99%	99%	WP_112362069.1	pfam06163	
41									
orf	34964-35563	597/199	20,2	Exodeoxirribonuclease	99%	100%	SJG28996.1	pfam16473	

Apêndice II

				VIII (<i>S. sonnei</i>)				
44								
orf45	35587-3576	171/57	6,8	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	100%	100%	AVR61859.1	ne
orf46	35771-36073	300/100	11,6	Proteína não caracterizada (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	CSS35333.1	
orf47	36024-36734	708/236	27,3	Proteína de antiterminação de fago (<i>S. flexneri</i>)	99%	100%	WP_112362068.1	pfam06323
orf48	36724-36969	243/81	9,1	Proteína gp39 de fago (<i>E. coli</i>)	99%	100%	AUO37516.1	pfam14549
orf49	37037-37633	594/198	22,4	Proteína contendo o domínio hélice (<i>E. coli</i>)	100%	100%	WP_052973356.1	pfam01381
orf50	37879-41874	3993/1331	150,7	Proteína hipotética (Enterobacterias)	100%	100%	WP_001683860.1	ne
orf51	41867-42058	189/63	8,0	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	97%	100%	WP_032143254.1	ne
orf52	42063-42389	324/108	12,9	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_096002451.1	ne
orf53	42392-42787	393/131	15,5	Proteína hipotética (Enterobacteriaceae)	100%	100%	WP_001542487.1	ne
orf54	42815-43102	285/95	10,5	Proteína gp32 do vírus (<i>Escherichia</i>)	93%	100%	NP_046927.1	pfam10554
orf55	43479-43643	162/54	6,2	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	98%	100%	WP_108997104.1	ne
orf56	43640-43873	231/77	8,4	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_114455238.1	ne
orf57	43870-44034	162/54	6,0	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	94%	100%	WP_072119805.1	ne
orf58	44080-45975	1893/631	72,6	Protelomerase (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_077108033.1	pfam16684

nt, nucleotídeo; aa, aminoácido; pfam, *Protein Families Database*; cd, *Conserved Domains*; ne, não encontrado. Análise realizada em banco de dados *Genbank* ferramentas Blastp, Blastn e Blastx.

Tabela 2. Análise das ORFs localizadas no *contig* 2, 6134pb, isolado da amostra produtora de substância antagonista SS9

Gene	Localização no plasmídio	Comprimento (nt/aa)	Massa molecular	Produto	Identidade	Query coverage	Nº de acesso	Nº de acesso pfam e cd query
<i>orf1</i>	341-749	399/132	15,2	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_096200387.1	ne
<i>repa</i>	933-1847	915/304	34,4	Proteína de replicação de plasmídio (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	WP_077123256.1	pfam03090
<i>ce8l</i>	2342-2485	141/47	4,8	Proteína de Lise E8 (<i>Enterobacteriaceae</i>)	100%	100%	WP_001314446.1	pfam02402
<i>cxi</i>	2547-2807	261/86	10,0	Proteína de imunidade de bacteriocina (<i>S. sonnei</i>)	98%	100%	WP_077108249.1	cd16363
<i>cxa</i>	2810-4537	1728/575	61,2	Colicina (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	WP_052973162.1	pfam12639
<i>orf6</i>	4759-5292	534/177	19,7	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)	99%	100%	WP_113977127.1	ne
<i>mob</i>	5295-6095	801/266	31,5	Proteína de mobilização (<i>S. sonnei</i>)	100%	100%	WP_050541757.1	pfam03389

5 nt, nucleotídeo; aa, aminoácido; pfam, *Protein Families Database*; cd, *Conserved Domains*; ne, não encontrado. Análise realizada em banco de dados *Genbank* ferramentas Blastp, Blastn e Blastx.

10

Tabela 3. Análise das ORFs localizadas no *contig* 3, 5230pb, isolado da amostra produtora de substância antagonista SS9

Gene	Localização no plasmídio	Comprimento (nt/aa)	Massa molecular	Produto	Identidade	Query coverage	Nº de acesso subject	Nº de acesso pfam e cd query
<i>rop</i>	5114-155	192/64	7,2	Proteína Rop (bactérias)	100%	100%	WP_001041621.1	pfam01815
<i>cxl</i>	1182-1520	342/113	13,1	Proteína de lise para colicina (Enterobacteriaceae)	100%	100%	WP_000058755.1	pfam03526
<i>cea</i>	1523-3085	1563/521	57,2	Colicina E1 (Enterobacteriaceae)	100%	100%	WP_023150412.1	pfam01024
<i>exc1</i>	3363-3782	417/139	16,7	Proteína de exclusão de entrada 1 (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_072113988.1	pfam04111
<i>exc2</i>	3863-4282	417/139	15,7	Proteína de exclusão de entrada 2 (<i>S. sonnei</i>)	99%	100%	WP_112367404.1	pfam04111
<i>mob</i>	4507-4830	321/107	12,0	Proteína para mobilização de plasmídio (Enterobacteriaceae)	99%	100%	WP_001699352.1	prk13877

5 nt, nucleotídeo; aa, aminoácido; pfam, *Protein Families Database*; cd, *Conserved Domains*; ne, não encontrado. Análise realizada em banco de dados *Genbank* ferramentas Blastp, Blastn e Blastx.

Tabela 4. Análise das ORFs localizadas no *contig* 4, 2076pb, isolado da amostra produtora de substância antagonista SS9

Gene	Localização no plasmídeo	Comprimento (nt/aa)	Massa molecular	Produto	Identidade	Query coverage	N° de acesso subject	N° de acesso pfam e cd query
<i>rve</i>	64-768	702/234	27,9	Transposase (<i>S. flexneri</i> 4c)	99%	100%	AJQ17476.1	pfam13610
<i>dfr</i>	864-1373	507/169	19,0	Diidrofolato redutase resistente ao trimetopim (<i>Gammaproteobacteria</i>)	100%	100%	WP_000571065.1	pfam00186
<i>sbcd</i>	1370-2026	639/213	23,7	Regulador de resposta (<i>S. sonnei</i>)	98%	100%	WP_077137812.1	cd00840

5 nt, nucleotídeo; aa, aminoácido; pfam, *Protein Families Database*; cd, *Conserved Domains*; ne, não encontrado. Análise realizada em banco de dados *Genbank* ferramentas Blastp, Blastn e Blastx.

