

PATRÍCIA LUCIANA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINA SINTETIZADA
POR AMOSTRA DE *Shigella sonnei* ISOLADA DE
CRIANÇA COM DIARREIA AGUDA

UFMG

2013

Patrícia Luciana de Oliveira

Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostra de *Shigella sonnei* isolada de criança com diarreia aguda

Dissertação 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 Mestre em Microbiologia

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientadores: Luiz de Macêdo Farias

Mireille Ângela Bernardes Sousa

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

Belo Horizonte

2013

COLABORAÇÃO

Edilberto Nogueira Mendes - Faculdade de Medicina/UFMG

Gabriel Pissolati Mattos Bretz (Iniciação Científica) - ICB/UFMG

Jamil Silvano Oliveira - ICB/UFMG

Luciano Paulino Silva - EMBRAPA/DF

Marcelo Matos Santoro - ICB/UFMG

Marcelo Porto Bemquerer - EMBRAPA/DF

Raiane Alves Leão (Iniciação Científica) - ICB/UFMG

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

Folha de aprovação

A Deus e à minha família,
Raimundo, Vera e Marcelo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de estudá-la. Obrigada, Senhor, por Sua constante presença em minha vida. Obrigada por tudo que sou e que tenho.

Aos meus pais, Vera e Raimundo, por estarem sempre presentes em minha vida, torcendo por minhas conquistas e me apoiando nas minhas dificuldades. Muito obrigada pelos incentivos, por acreditarem no meu trabalho e por não medirem esforços para me ajudarem. Não há palavras para agradecer!

Ao Marcelo, meu irmãozinho preferido! Muito obrigada pela companhia, pela amizade e pela paciência.

Aos meus demais familiares, que torceram por mim e vibraram com minhas vitórias.

À minha orientadora, Prof.^a Paula, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada pela atenção, disponibilidade, dedicação e pelo carinho com o qual você me orienta. Obrigada pelo exemplo de profissional e por fazer parte da minha formação. E também muito obrigada pela paciência ao corrigir minha dissertação!

Ao meu coorientador, Prof. Luiz, pela presença, atenção e assistência em todos os momentos. Sempre preocupado com o andamento dos trabalhos e nunca medindo esforços para que tudo corresse bem. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Dra. Mireille, por estar sempre disposta a ajudar. Obrigada por fazer parte da minha formação, desde a iniciação científica. Tive muita sorte em trabalhar com você!

Ao Jamil, pela paciência e disponibilidade. Muito obrigada por sempre estar disposto a ajudar, tirar dúvidas e nunca desistir dos experimentos de purificação. Obrigada pelo otimismo nos momentos em que parecia que nada ia dar certo. Você foi fundamental na realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao Luciano Paulino Silva e, em especial, ao Marcelo Porto Bemquerer, pela valiosa colaboração. Muito obrigada pelo empenho e atenção ao me ajudar a concluir os experimentos.

Aos Profs. Jacques e Flaviano, pela disponibilidade em participar da banca examinadora deste trabalho, e à Prof.^a Sílvia, suplente, pela emissão do parecer.

Ao Rodrigo, que me orientou durante seu doutorado. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você e pelos valiosos ensinamentos. Obrigada também pela atenção dedicada, mesmo depois de vários anos após o término do trabalho!

Às Prof.^{as} Simone e Dodora, pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigada pelo carinho demonstrado durante todo o período em que trabalhei no Laboratório.

À Raiane, minha “filhota”, por toda dedicação. Sempre calma nos momentos estressantes e transbordando energia positiva para que tudo desse certo! Obrigada pela valiosa ajuda neste trabalho. Muito sucesso para você e continue de boa!!!

Ao Gabriel, sempre disposto a ajudar. Mesmo chegando no final do meu mestrado, sua colaboração foi muito valiosa. Várias conquistas te esperam! Muito obrigada pela dedicação!

À Daniela, amiga desde as “bodadas” depois do almoço durante a graduação. Muito obrigada pela sua calorosa companhia e pela colaboração em diversos momentos no dia a dia!

À Anna, pequena grande garota, companheira de bancada. Obrigada pelo carinho e pela alegria que você transborda! Foram muito proveitosas todas as discussões sobre resultados e experimentos!

À Jaqueline, sempre amiga e sempre disposta a ajudar. Minha “irmãzinha” desde a iniciação científica. Muito obrigada pelos papos gostosos e por toda força! Que nunca falte ninguém para colocar papelzinho nos seus tubinhos!

À Natália, por sempre dispor de um tempinho para me ajudar. Muito obrigada pela companhia, pelas conversas gostosas e pela valiosa ajuda em vários momentos. Torço muito por você, garota! Você vai longe!

Ao Sérgio, membro fundamental do MOA. Sempre disposto a ensinar e a ajudar. Muito obrigada pelo apoio e pelas numerosas e valiosíssimas ajudas. Te desejo todo sucesso do mundo! Você vai longe!

À Luzia, por toda dedicação e amizade. Somos todos gratos pelo carinho com que você cuida da gente no Laboratório, mesmo nas suas dificuldades. Muito obrigada por tudo!

À Renata, que de ingrata não tem nada. Sua presença enche o ambiente de alegria! Muito obrigada pelos conselhos e consultorias. Muito obrigada pela companhia!

Ao Suuuuper Augusto. Muito obrigada pelas caronas, pelos papos divertidíssimos e pelo apoio moral! Te desejo muito sucesso e muitas alegrias, para você, a “patroa” e o “menino”!

Ao João Fernando, pelas várias consultorias sobre CIM. Obrigada pela atenção e paciência. Obrigada também pela amizade! Adoro o seu doce mau humor!

Aos demais colegas do Laboratório de hoje, ontem e sempre: Hanoch, Mariana, Juliana, Lorena, Amanda, Bruna, Yameric, Marcela, Thais Abreu, Thais Santos, Doris, Luciana, Luciana Gaia, Rafaela, Diego, Rafael Mangerotti, Renato, Patrícia, Gabriela, Carol Valeff, João Paulo, Luciano, Simone Cristina e Renata Barreto, dentre outros. Todos com os quais convivi nestes seis anos de caminhada. Muito obrigada por toda ajuda, companheirismo e momentos de descontração. Vocês estão guardados para sempre no meu coração!

Aos colegas de mestrado e de graduação. Aprendi muito com vocês!

Aos amigos de todas as horas, por tornarem a vida mais bonita e gratificante. Muito obrigada!

À UFMG, em especial aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Microbiologia do ICB.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG, PRPq/UFMG e TWAS, pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta conquista, o meu muito obrigado!

“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende,
mais, é só a fazer outras maiores perguntas.”

ROSA, João Guimarães. Grande Sertão: Veredas.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE TABELAS	Xiv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiii
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxvi
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 <i>Shigella</i> E ENTERITE INFECCIOSA AGUDA	27
1.1.1 HABILIDADES DE VIRULÊNCIA DE <i>Shigella</i>	28
1.1.2 SHIGELOSE: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E TRATAMENTO	32
1.2 MICROBIOTA INTESTINAL	35
1.2.1 IMPLANTAÇÃO	36
1.2.2 COMPOSIÇÃO	37
1.2.3 RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO	39
1.3 BACTERIOCINAS	42
1.3.1 PAPEL DAS BACTERIOCINAS	43
1.3.2 APLICAÇÕES DAS BACTERIOCINAS	44
1.3.3 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E ARCHAEA	46
1.3.4 COLICINAS E MICROCINAS	48
1.3.4.1 PRODUÇÃO DE COLICINAS POR MEMBROS DO GÊNERO <i>Shigella</i>	51
2. JUSTIFICATIVA	53

3.	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS	56
4.2	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES E INTRACELULARES	57
4.3	TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75	59
4.4	TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE C75	59
4.5	AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DA AMOSTRA PRODUTORA E DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75	60
4.6	AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE POPULACIONAL DA AMOSTRA PRODUTORA EM RELAÇÃO À CARACTERÍSTICA <i>EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO</i>	61
4.7	ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE C75	61
4.7.1	DETERMINAÇÃO DA CIM	61
4.7.2	DETERMINAÇÃO DA CBM	62
4.7.3	CINÉTICA DE AÇÃO	62
4.8	PURIFICAÇÃO DA(S) BACTERIOCINA(S) PRESENTE(S) EM C75	63
4.8.1	CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA - FPLC	63
4.8.2	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR - FPLC	63
4.8.3	CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA - HPLC	64
4.9	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	64
4.10	SDS-PAGE	65
4.11	ESPECTROMETRIA DE MASSA	65

4.12	REDUÇÃO, ALQUILAÇÃO E TRIPSINÓLISE DA BACTERIOCINA PARCIALMENTE PURIFICADA	67
4.13	SEQUENCIAMENTO	67
5	RESULTADOS	69
5.1	TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75	69
5.2	TITULAÇÃO DA FRAÇÃO C75	69
5.3	AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DA AMOSTRA PRODUTORA E DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75	69
5.4	AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE POPULACIONAL DA AMOSTRA PRODUTORA EM RELAÇÃO À CARACTERÍSTICA <i>EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO</i>	74
5.5	ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE C75	74
5.5.1	CIM	74
5.5.2	CBM	77
5.5.3	CINÉTICA DE AÇÃO	77
5.6	PURIFICAÇÃO DA(S) BACTERIOCINA(S) PRESENTE(S) EM C75	80
5.6.1	CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA - FPLC	80
5.6.2	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR - FPLC	80
5.6.3	CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA - HPLC	80
5.7	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	81
5.8	SDS-PAGE	82
5.9	ESPECTROMETRIA DE MASSA	97
5.10	SEQUENCIAMENTO	97
5.11	AVALIAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	109
6	DISCUSSÃO	121

7	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	137
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
	ANEXO A. Amostra (a): caracterização e espectro dos fragmentos (MS/MS)	155
	ANEXO B. Amostra (b): caracterização e espectro dos fragmentos (MS/MS)	165
	ANEXO C. Amostra (c): caracterização e espectro dos fragmentos (MS/MS)	173

LISTA DE QUADROS

1	Características dos íons detectados: sequências, massas moleculares e proteínas 100% similares - Amostra (a).	156
2	Características dos íons detectados: sequências, massas moleculares e proteínas 100% similares - Amostra (b).	166
3	Características dos íons detectados: sequências, massas moleculares e proteínas 100% similares - Amostra (c+d).	174

LISTA DE TABELAS

1	Espectro de atividade antagonista de <i>Shigella sonnei</i> (SsP).	71
2	Cinética da ação do extrato C75 contra <i>Shigella sonnei</i> .	77
3	Concentrações proteicas das frações provenientes das cromatografias por troca iônica e exclusão molecular	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo de patogenicidade de <i>Shigella</i> : invasão e inflamação provocada pelo microrganismo (modificado de SCHROEDER & HILBI, 2008 e HODGES & GILL, 2010).	31
Figura 2	Representação esquemática da adesão, translocação e modo de ação das colicinas mais bem estudadas (modificado de CASCALES <i>et al.</i> , 2007).	52
Figura 3	Avaliação da atividade dos extratos proteicos intracelulares C30 (A) e C75 (B) e extracelular S75 (C), precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 30% e 75%, contra <i>Shigella sonnei</i> SsR.	70
Figura 4	Titulação da atividade antagonista da fração C75 (extrato proteico intracelular precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75%, contra <i>Shigella sonnei</i> SsR. Título = 819.200 UA/mL.	70
Gráfico 1	Frequência de amostras de <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella sonnei</i> e <i>Enterobacter</i> spp. sensíveis à ação antagonista expressa por <i>S. sonnei</i> SsP.	72
Figura 5	Avaliação do espectro de ação de <i>Shigella sonnei</i> e dos extratos proteicos intracelulares C30 (A) e C75 (B) e extracelular S75 (C), precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 30% e 75%. A. Halo grande, aproximadamente 3 cm de diâmetro; B. Halo médio, aproximadamente 2 cm de diâmetro; e C. Halo pequeno, restrito à borda da amostra produtora.	73
Figura 6	Atividade antagonista dos extratos proteicos intracelulares C30 (A) e C75 (B) e extracelular S75 (C), precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 30% e 75% contra amostra de <i>S. sonnei</i> . A amostra de <i>S. sonnei</i> produtora não apresentou atividade.	75

Figura 7	Distribuição da característica <i>expressão de antagonismo</i> na população de <i>Shigella sonnei</i> SsP. Observa-se atividade para todos os clones e variação no tamanho dos halos para as diferentes amostras reveladoras utilizadas. A. <i>S. sonnei</i> SsR, B. <i>S. sonnei</i> Ss1, C. <i>Escherichia coli</i> K 12 Row e D. <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022.	76
Gráfico 2	Curva de crescimento da amostra de <i>Shigella sonnei</i> SsR na ausência e na presença do extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% (C75; 200 UA/mL).	78
Gráfico 3	Curva de inibição da amostra de <i>Shigella sonnei</i> SsR na presença do extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% (C75; 200 UA/mL).	79
Figura 8	Fluxograma do processo de purificação da(s) substância(s) antagonista(s): cromatografia por troca iônica e exclusão molecular.	83
Figura 9	Fluxograma do processo de purificação da(s) substância(s) antagonista(s): cromatografia de fase reversa.	84
Figura 10	Cromatografia por troca iônica de C75 (extrato proteico intracelular precipitado em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75%).em coluna Mono-Q TM 5/50 GL Tricorn TM , previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 e eluída no mesmo tampão acrescido de NaCl 1 M, em gradiente linear de 0-100% (vermelho). Leitura de absorbância em 280 nm (preto). Titulação da atividade antagonista de cada uma das frações em azul. Os picos A (frações 1 a 5), B (frações 13 e 14) e C (frações 15 e 16), ativos, foram encaminhados para cromatografia por exclusão molecular.	85

- Figura 11 Cromatografia por exclusão molecular do pico A (frações 1 a 5) proveniente da cromatografia por troca iônica. Coluna Superose 12 HR 10/30 (GE Healthcare), fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h. Monitoramento com leituras a 280 nm (preto). A titulação da atividade antagonista de cada uma das frações está representada em azul. Os picos A.1 a A.6, frações 2 a 11 apresentaram atividade. 87
- Figura 12 Cromatografia por exclusão molecular do pico B (frações 13 e 14) proveniente da cromatografia por troca iônica. Coluna de Superose 12 HR 10/30, fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h. Leitura a 280 nm (preto). Titulação da atividade antagonista de cada uma das frações em azul. Os picos B.1 a B.4, frações 4 a 7, 10 e 11 apresentaram atividade. 88
- Figura 13 Cromatografia por exclusão molecular do pico C (frações 15 e 16) proveniente da cromatografia por troca iônica. Coluna Superose 12 HR 10/30 (GE Healthcare), fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h. Monitoramento com leituras a 280 nm (preto). A titulação da atividade antagonista de cada uma das frações está representada em azul. Os picos C.1 a C.5, frações 2 a 11 apresentaram atividade. Os picos C.2 (frações 3 a 5) e C.4 (fração 10) foram encaminhados para cromatografia por fase reversa. 89

- Figura 14 Cromatografia de fase reversa em coluna μ RPC C2/C18 do pico C.2 (frações 3 a 5) proveniente da cromatografia por filtração molecular. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (azul), 220 nm (vermelho) e 215 nm (rosa). Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde). As frações B4 a C10 apresentaram atividade antagonista e as frações B4 a B9 e B10 a B15 foram encaminhadas para *recromatografia* (fase reversa). 90
- Figura 15 Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 das frações B4 a B9 (*pool* 1) provenientes de cromatografia de fase reversa. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa). Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde). As frações 35 a 37 apresentaram atividade antagonista e foram encaminhadas para *recromatografia* (fase reversa). 91
- Figura 16 Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 das frações B10 a B15 (*pool* 2) provenientes de cromatografia de fase reversa. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa). Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde). As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 33+34 e 35+36 foram *recromatografia* (fase reversa). 92

- Figura 17 Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 da fração 35 proveniente de cromatografia de fase reversa. Coluna equilibrada com 20% de solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), perfazendo gradiente de 20 a 100% de acetonitrila (verde). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa). As frações 35 a 41 apresentaram atividade antagonista e as frações 35 a 39 foram encaminhadas para espectrometria de massa. 93
- Figura 18 Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 da fração 37 proveniente de cromatografia de fase reversa. Coluna equilibrada com 20% de solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), perfazendo gradiente de 20 a 100% de acetonitrila (verde). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa). As frações 37 a 40 apresentaram atividade antagonista e as frações 37 e 38 foram encaminhadas para espectrometria de massa. 94
- Figura 19 Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 das frações 33 e 34 provenientes de cromatografia de fase reversa. Coluna equilibrada com 20% de solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), perfazendo gradiente de 20 a 100% de acetonitrila (verde). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa). As frações 34 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 34 a 37 foram encaminhadas para espectrometria de massa. 95

- Figura 20 Cromatografia de fase reversa em coluna Poros[®] C18 do pico C.4 (fração 10) proveniente da cromatografia por exclusão molecular. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (azul), 220 nm (vermelho) e 215 nm (rosa). Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde). As frações C1 a C10 apresentaram atividade antagonista e a fração C4 foi encaminhada para espectrometria de massa. 96
- Figura 21 SDS-PAGE e revelação *in situ* da atividade antagonista do extrato proteico intracelular precipitado com (NH₄)₂SO₄ à saturação de 75% contra *Shigella sonnei* SsR. 1. C75 e 2. Padrão de massa molecular pré-corado (Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). 98
- Figura 22 SDS-PAGE e revelação *in situ* da atividade antagonista das frações originadas da cromatografia de troca iônica do extrato proteico intracelular precipitado com (NH₄)₂SO₄ à saturação de 75% contra *Shigella sonnei* SsR. 1. Pico C, *pool* das frações 15 e 16; 2. Pico B, *pool* das frações 13 e 14; 3. Pico A, *pool* das frações 1 a 5; e 4. 2. Padrão de massa molecular pré-corado (Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). 99
- Figura 23 SDS-PAGE e revelação *in situ* da atividade antagonista dos picos ativos originados da cromatografia por exclusão molecular do pico C contra *Shigella sonnei* SsR. 1. Pico C.5; 2. Pico C.4; 3. Pico C.3; 4. Pico C.2; 5. Pico C.1; 6. Pico C; 7. Extrato proteico intracelular precipitado com (NH₄)₂SO₄ à saturação de 75% (C75); e 8. Padrão de massa molecular pré-corado (Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). 100

Figura 24	Espectrometria de massa - frações <i>recromatografadas</i> . A, frações ativas originadas da cromatografia de fase reversa; B, frações submetidas a espectrometria de massa; C, frações nas quais foram detectados íons.	101
Figura 25	Características das corridas cromatográficas de fase reversa, frações ativas encaminhadas para espectrometria de massa e massa molecular dos íons.	102
Figura 26	Espectrometria de massa em matriz DHB da fração 38 representada na figura 17 [letra (a) na FIG. 25]. Observa-se a presença de massas moleculares de 34.180,613 e 38.875,863 Da.	103
Figura 27	Espectrometria de massa em matriz DHB da fração 38 representada na figura 18 [letra (b) na FIG. 25]. Observa-se a presença de massas moleculares de 34.461,712 e 24.688,769 Da.	104
Figura 28	Espectrometria de massa em matriz DHB da fração 35 representada na figura 19 [letra (c) na FIG. 25]. Observa-se a presença apenas da massa molecular de 22.443,412 Da.	105
Figura 29	Espectrometria de massa em matriz ácido sinapínico da fração 35 representada na figura 19 [letra (c) na FIG. 25]. Observa-se a presença apenas da massa molecular de 22.443,446 Da.	106
Figura 30	Espectrometria de massa em matriz ácido sinapínico da fração 36 representada na figura 19 [letra (d) na FIG. 25]. Observa-se a presença apenas da massa molecular de 22.443,446 Da.	107
Figura 31	Espectrometria de massa da fração C4 representada na figura 20. Observa-se a presença de molécula de 18.574,285 Da.	108
Figura 32	Espectrometria de massa da amostra (a) em matriz alfaciano. Método LP 12 kDa.	110
Figura 33	Espectrometria de massa da amostra (a) em matriz ácido sinapínico. Método LP 12 kDa.	111

Figura 34	Espectrometria de massa da amostra (b) em matriz alfaciano. Método LP 12 kDa.	112
Figura 35	Espectrometria de massa da amostra (b) em matriz ácido sinapínico. Método LP 12 kDa.	113
Figura 36	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LP 12 kDa.	114
Figura 37	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico. Método LP 12 kDa.	115
Figura 38	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LP 44 kDa.	116
Figura 39	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico. Método LP 44 kDa.	117
Figura 40	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico. Método LP 44 kDa.	118
Figura 41	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico. Método LP 66 kDa.	119
Figura 42	Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LPepMix.	120

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência aguda
BHI	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
C30	Fração proteica intracelular obtida por precipitação com 30 % de sulfato de amônio
C75	Fração proteica intracelular obtida por precipitação com 75 % de sulfato de amônio
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DTT	Ditiotreitol
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EHEC	<i>E. coli</i> enteremorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
IFN- γ	Interferon gama
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MH	<i>Mueller Hinton Broth</i>
MRS	deMan, Rogosa e Sharpe
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
PCR	Reação de polimerização em cadeia

RNA	Ácido ribonucleico
S75	Fração proteica extracelular obtida por precipitação com 75 % de sulfato de amônio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
ShET	Enterotoxinas de <i>Shigella</i>
SST3	Sistema de secreção tipo III
TFA	Ácido trifluoroacético
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga
UFC	Unidade formadora de colônia
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina

RESUMO

Shigella é um dos agentes bacterianos mais relevantes de diarreia aguda. Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos antimicrobianos sintetizados por diversas bactérias, inclusive *Shigella*, que, aparentemente, contribuem para a virulência do organismo. Desenvolvemos este estudo com o objetivo de caracterizar uma bacteriocina produzida por uma amostra de *Shigella sonnei* (SsP) isolada de fezes diarreicas. O espectro de atividade de SsP e a distribuição da característica *expressão de antagonismo* na população foram avaliados. Foram determinadas CIM, CBM e cinética de ação de C75 (extrato intracelular precipitado com 75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). A massa molecular da(s) bacteriocina(s) presentes em C75 foi estimada por SDS-PAGE/revelação *in situ*. C75 foi submetido a cromatografia e frações parcialmente purificadas foram submetidas a espectrometria de massa (MS). Observou-se espectro restrito de atividade, contra amostras diarreogênicas e da microbiota intestinal. A habilidade antagonista estava distribuída homogeneamente na população. A equivalência entre CIM e CBM e o curto período necessário para eliminação da bactéria reveladora demonstraram a atividade bactericida de C75. Duas bandas ativas com massas moleculares de 57 e 66 kDa foram detectadas. Este dado, bem como a diversidade de tamanhos de halos de inibição e a presença de várias frações ativas em cada etapa de purificação, sugerem a síntese de mais de uma bacteriocina. O protocolo possibilitou a purificação parcial da(s) bacteriocina(s) presentes em C75, como demonstrado por MS. A sequência dos fragmentos proteicos gerados por tripsinólise das frações parcialmente purificadas não foi similar à de nenhuma substância antagonista depositada nos bancos de dados avaliados.

Palavras-chave: *Shigella*, bacteriocina, substância antagonista, fator de virulência, purificação de proteína, enterite aguda

ABSTRACT

Shigella is one of the most important bacterial agents of acute diarrhea. Bacteriocins are antimicrobial proteinaceous substances synthesized by a huge variety of bacteria including *Shigella* that seem to contribute to the virulence of the organism. We addressed the characterization of a bacteriocin produced by a *Shigella sonnei* isolate (SsP). The activity spectrum of SsP and the distribution of the characteristic ability to synthesize bacteriocins among SsP were evaluated. MIC and MBC of the intracellular fraction precipitated with 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were also determined. Molecular mass of bacteriocin(s) found in C75 was estimated by SDS-PAGE. C75 was submitted to sequential steps of chromatography and partially purified fractions were evaluated by mass spectrometry (MS). A narrow activity spectrum against taxonomically related organisms both enteropathogens and members of the intestinal microbiota was observed. The ability to express antagonism was homogeneously distributed among SsP population. CIM and CBM values as well as the short period required to eliminate the indicator strain indicated that C75 is bactericidal. Two protein bands of 57 and 66 kDa showed activity. Taken together this result, the diversity of inhibition halos sizes, and the detection of several active fractions in every purification step suggest that SsP synthesizes more than one bacteriocin. The partial purification of the bacteriocin(s) found in C75 was achieved as demonstrated by MS. Sequences obtained did not match any bacteriocin stored in the searched databases.

Keywords: *Shigella*, bacteriocin, antagonistic substance, virulence factor, protein purification, acute diarrhea

1 INTRODUÇÃO

5 1.1 *Shigella* E ENTERITE INFECCIOSA AGUDA

Os representantes do gênero *Shigella*, incluído na família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram negativos, imóveis, não capsulados e anaeróbios facultativos (SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005). *Shigella* compartilha várias características com o patótipo enteroinvasor de *Escherichia coli*. Tal semelhança é comprovada por estudos genéticos e seria suficiente para agrupar as amostras em um mesmo gênero. Entretanto, diferenças na motilidade, perfil metabólico e manifestações clínicas dão suporte à decisão de manter estas bactérias em gêneros distintos (CHAUDHURI & HENDERSON, 2012; VAN DEN BELD & REUBSAET, 2012). Segundo Zhang e Lin (2012), os resultados de análises filogenéticas sugerem que *Shigella* tenha se originado a partir de, pelo menos, três ancestrais, que evoluíram em único clado. Além disso, indicam a presença frequente de elementos genéticos móveis em regiões conservadas do genoma de *Shigella*, o que significa que a bactéria pode ter experimentado evolução convergente envolvendo transferência horizontal de genes.

São conhecidas quatro espécies de *Shigella*, classificadas de acordo com características bioquímico-fisiológicas e antigênicas: *S. dysenteriae* ou sorogrupo A, *S. flexneri* ou sorogrupo B, *S. boydii* ou sorogrupo C e *S. sonnei* ou sorogrupo D (SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005; SOUSA *et al.*, 2010). A classificação baseada no tipo antigênico O, componente do lipopolissacarídeo presente na parede externa da bactéria, permite a distinção de 13 sorotipos de *S. dysenteriae*, 15 de *S. flexneri*, 18 de *S. boydii* e apenas um de *S. sonnei*. Os sorogrupos A, B e C são muito semelhantes fisiologicamente, enquanto que *S. sonnei* pode ser diferenciada das demais espécies por reações positivas para β -D-galactosidase e ornitina descarboxilase (NIYOGI, 2005).

Espécies do gênero *Shigella* estão entre os agentes bacterianos mais comuns de enterite aguda, sendo responsáveis por cerca de 10 a 20% dos casos

da doença no mundo. A shigelose, comumente conhecida como disenteria bacilar aguda, manifesta-se pela eliminação de fezes em pequeno volume, com sangue, muco e pus, podendo ser acompanhada de febre, cólicas, tenesmo, fadiga, anorexia e mialgia generalizada (SUR *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2010; 5 NAVANEETHAN & GIANNELLA, 2011).

A enterite infecciosa aguda ainda é considerada um grave problema de saúde pública. Acomete, principalmente, crianças de países menos desenvolvidos, nos quais a falta de higiene e o acesso limitado a água potável e rede de esgoto facilitam sua disseminação. Fatores como má nutrição e carência 10 de intervenção médica adequada contribuem, de forma importante, para os índices elevados de mortalidade da doença (SUR *et al.* 2004; SCHROEDER & HILBI, 2008; PENG *et al.*, 2010).

15 1.1.1 HABILIDADES DE VIRULÊNCIA DE *Shigella*

Segundo Schroeder & Hilbi (2008), grande parte do conhecimento adquirido sobre a patogenicidade do gênero *Shigella* é proveniente de estudos que incluíram a espécie *S. flexneri*. Sabe-se, por exemplo, que a bactéria é 20 altamente infecciosa, sendo que apenas algumas células, entre 10 e 100, são suficientes para desencadear a enterite aguda. O organismo apresenta sistemas que conferem resistência à acidez, o que permite sua sobrevivência à passagem pelo estômago (WHO/V&B/99.26, 1999; SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005; SCHROEDER & HILBI, 2008).

A virulência de *S. flexneri* está associada à sua habilidade de invadir as 25 células epiteliais e se replicar no interior das mesmas, o que resulta em inflamação grave e destruição do tecido. O processo culmina com manifestações clínicas características, tais como microabscessos e ulceração da mucosa, dor de cabeça, desconforto, anorexia, vômitos ocasionais, diarreia aquosa, presença de 30 sangue, muco e pus nas fezes, cólicas abdominais e tenesmo. Pacientes com formas mais graves da doença podem apresentar mais de 20 episódios de evacuação por dia (WHO/V&B/99.26, 1999, BHATTCHARYA & SUR, 2003; JENNISON & VERNA, 2004; NIYOGI, 2005; HODGES & GILL, 2010).

Antes do processo de invasão celular propriamente dito, o microrganismo adere-se a células do hospedeiro. Muito pouco se sabe sobre as estruturas de adesão responsáveis por este primeiro contato. *Shigella* apresenta tropismo pelo epitélio do cólon e do reto, infectando, assim, o intestino grosso (REIS & HORN, 2010). Segundo Vazquez-Torres & Fang (2000), acredita-se que esta preferência esteja relacionada com diferenças na superfície das células M, embora receptores específicos que possam explicar esta seletividade ainda não tenham sido identificados.

Durante o processo de invasão, as amostras de *Shigella* cruzam o epitélio intestinal, uma barreira física e funcional de proteção do organismo hospedeiro contra a invasão por membros da microbiota indígena e por bactérias exógenas. Tal processo ocorre, inicialmente, via células M, células especializadas do epitélio intestinal que continuamente apresentam partículas do lúmen ao tecido linfóide adjacente, onde a resposta imune pode ser iniciada (PHILPOTT *et al.*, 2000; SCHROEDER & HIBLI, 2008). As células M são encontradas no epitélio associado ao folículo linfóide das placas de Peyer presentes ao longo do intestino delgado e em folículos linfóides de nódulos isolados no cólon e no reto (PHILPOTT *et al.*, 2000; CORR *et al.*, 2008).

Diversos genes, localizados em um grande plasmídio de virulência, são essenciais para a penetração da bactéria nas células hospedeiras (NHIEU & SANSONETTI, 1999; NIYOGI, 2005; MURRAY *et al.*, 2006). Estes genes codificam proteínas estruturais do SST3 e proteínas efetoras. SST3 é uma estrutura em forma de seringa, que transporta os efetores do citoplasma bacteriano para o citoplasma das células alvo (células M, enterócitos e macrófagos), onde induzem projeções da membrana celular, levando à fagocitose da bactéria e, posteriormente, à lise do vacúolo fagocítico. Além disso, algumas proteínas efetoras podem modular a resposta imune do hospedeiro (NHIEU & SANSONETTI, 1999; PHILPOTT *et al.*, 2000; WHO/CDS/SR/DRS/2001.8, 2001; PHALIPON & SANSONETTI, 2003; NIYOGI, 2005; MURRAY *et al.*, 2006; HODGES & GILL, 2010). *Shigella* sobrevive à fagocitose por meio de uma rápida indução de apoptose. A morte dos macrófagos presentes na submucosa, com os quais *Shigella* tem contato após passagem pelas células M, leva à liberação de IL-1 β e IL-18, resultando na atração de leucócitos polimorfonucleares para os

tecidos infectados. Ambas as citocinas são mediadores críticos para a resposta inflamatória massiva e aguda, que desestabiliza a integridade da parede intestinal e permite que as bactérias alcancem as células epiteliais localizadas em camadas mais profundas. Enquanto IL-1 β desencadeia a forte inflamação intestinal característica da shigelose, IL-18 está envolvida na geração de uma resposta inflamatória efetiva, ativando células *natural killer* e promovendo a produção de IFN- γ , amplificando, assim, a resposta imune inata (FIG. 1) (MURRAY *et al.*, 2006; SCHROEDER & HILBI, 2008).

Após escape dos macrófagos, *Shigella* invade os enterócitos pela superfície basolateral. Uma vez no citoplasma da célula, o microrganismo rompe o fagossomo e é capaz de se multiplicar e se disseminar horizontalmente, invadindo as células epiteliais adjacentes. Para isto, acumula actina polimerizada em um de seus polos, formando uma espécie de *cauda*, que a propulsiona através do citoplasma. Entretanto, esta estratégia não é completamente vantajosa para a bactéria, uma vez que a invasão das células epiteliais também estimula uma forte resposta inflamatória. Como consequência da invasão tecidual, as células epiteliais secretam uma série de citocinas, como IL-8, que, juntamente com a resposta desencadeada pela presença da bactéria, atraem leucócitos polimorfonucleares da camada subepitelial para o lúmen intestinal. Dessa forma, a morte dos macrófagos, a destruição da camada epitelial e o grande fluxo de células polimorfonucleares exacerbam a infecção bacteriana e a lesão tecidual (FIG. 1) (MURRAY *et al.*, 2006; CORR *et al.*, 2008; SCHROEDER & HILBI, 2008; HODGES & GILL, 2010; REIS & HORN, 2010). A grave destruição tecidual interfere nos processos de absorção de água, nutrientes e solutos, o que causa diarreia relativamente aquosa, assim como a presença de sangue e muco nas fezes, característica típica da shigelose. Além disso, *Shigella* também é capaz de produzir toxinas (como discutido a seguir), que podem alterar o movimento de fluidos, e proteínas, que danificam a junção célula-célula, embora estes fatores sejam considerados menos importantes no desenvolvimento da diarreia associada à bactéria (FIG. 1) (SCHROEDER & HILBI, 2008; HODGES & GILL, 2010).

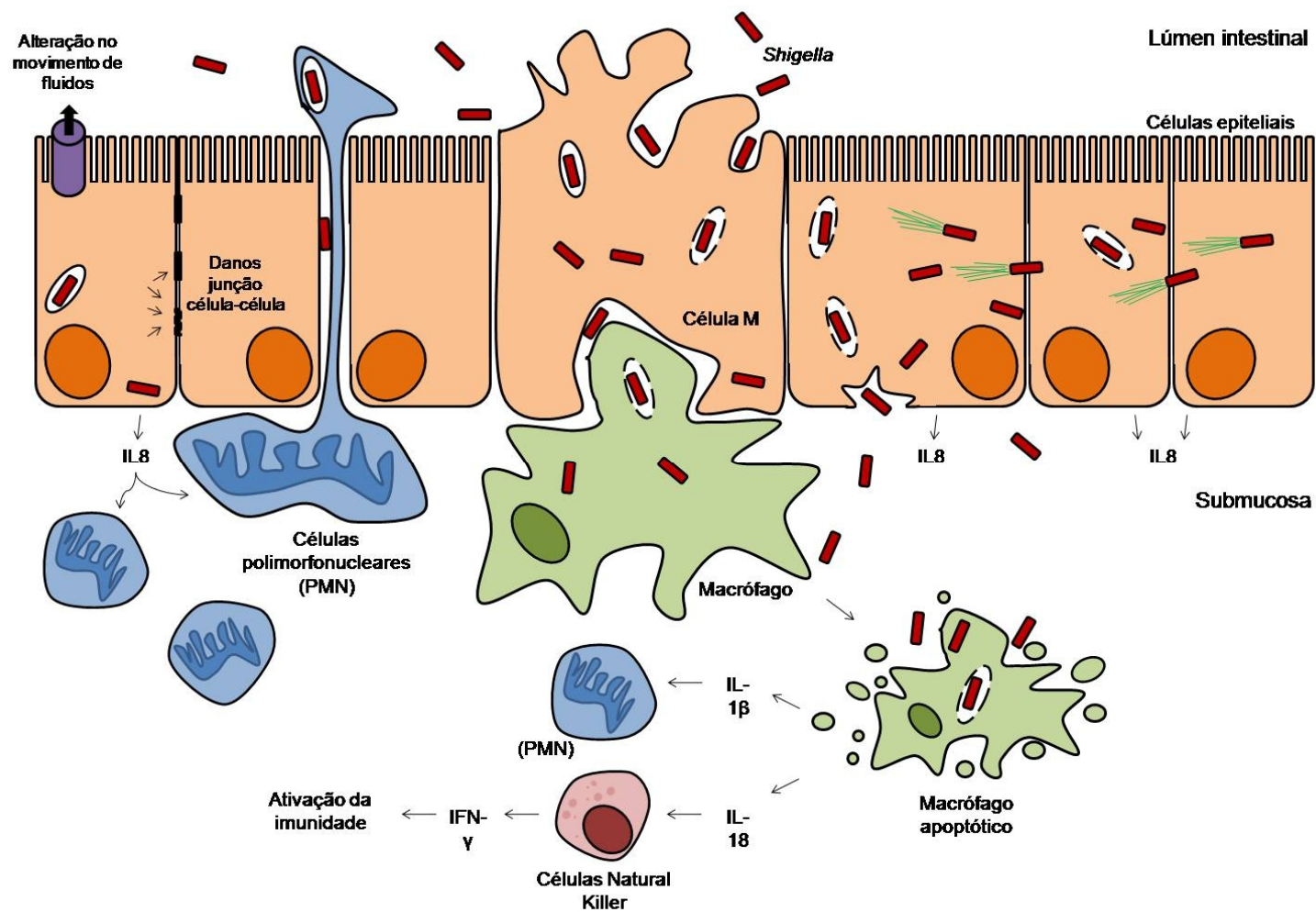


Figura 1, Mecanismo de patogenicidade de *Shigella*: invasão e inflamação provocada pelo microrganismo (modificado de SCHROEDER & HILBI, 2008 e HODGES & GILL, 2010),

Além da invasão, *Shigella* também apresenta a habilidade de produzir três tipos de toxinas, as enterotoxinas de *Shigella*, denominadas ShET 1 e 2, e a toxina shiga. A ShET1 é codificada pelo cromossomo bacteriano e produzida por todas as amostras de *S. flexneri* 2a e a ShET2, cuja informação genética localiza-se no plasmídio de virulência da bactéria, é observada em vários sorotipos de *Shigella* e também em EIEC. Estas toxinas induzem a secreção de fluido no intestino, estando associadas à fase aquosa da diarreia (WHO/V&B/99.26, 1999; WHO/CDS/SR/DRS/2001.8, 2001; NIYOGI, 2005; MURRAY *et al.*, 2006; SCHROEDER & HILBI, 2008). A toxina shiga, produzida por *S. dysenteriae*, STEC e EHEC, é uma toxina citotóxica, neurotóxica e enterotóxica, codificada por genes cromossômicos. Nas células alvo, a toxina shiga inibe a síntese proteica, por inativar os ribossomos. Além disto, também pode induzir a apoptose. Embora não seja essencial para a virulência do organismo, pode contribuir muito para a maior gravidade da doença, provocando destruição do endotélio, isquemia do tecido intestinal, danos aos rins e ao sistema nervoso central. Devido à alta toxicidade da toxina shiga, infecções por *S. dysenteriae* sorotipo 1 estão frequentemente associadas com complicações potencialmente fatais (NIYOGI, 2005; SCHROEDER & HILBI, 2008; BERGAN *et al.*, 2012).

20

1.1.2 SHIGELOSE: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A shigelose ainda é uma doença bastante prevalente, embora já tenham se passado 100 anos desde sua primeira descrição (NIYOGI, 2005). Estima-se que ocorram entre 80 e 165 milhões de episódios da doença anualmente, 99% deles em países em desenvolvimento (RAM *et al.*, 2008; SHAKOOR *et al.*, 2012). O reservatório natural da bactéria é o homem e o período de incubação varia de um a quatro dias. A duração do quadro está diretamente relacionada ao período de excreção fecal do agente infeccioso, o que pode se prolongar por até quatro semanas (SUR *et al.*, 2004).

A transmissão da infecção se dá pela via fecal-oral, por contato direto pessoa-pessoa ou por meio de água, alimentos ou fômites contaminados. Em locais onde o saneamento básico é inadequado, moscas podem funcionar como

vetor, contaminando alimentos (WHO/V&B/99.26, 1999; SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005).

Com relação à prevalência das espécies do gênero, *S. sonnei* é mais comumente observada em países industrializados, enquanto *S. flexneri* é predominante em países em desenvolvimento (SUR *et al.*, 2004; RAM *et al.*, 2008). No Brasil, *S. flexneri* é mais prevalente nas regiões norte e nordeste, enquanto *S. sonnei* é mais frequente no sudeste (SOUSA *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2012). Estudos recentes indicam que *S. sonnei* vem sendo detectada, de uma forma geral, mais frequentemente que *S. flexneri* no Brasil e em países como a Tailândia e a Turquia, o que provavelmente reflete o desenvolvimento econômico destes países (RAM *et al.*, 2008). *S. dysenteriae* sorotipo 1, por sua vez, vem sendo considerada a principal responsável por epidemias de disenteria em todo o mundo. A forma de apresentação da doença associada ao sorotipo é grave e a bactéria é, usualmente, multirresistente a antimicrobianos, estando associada a grandes epidemias e pandemias, com taxas de morbidade e mortalidade elevadas (SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005).

Outro fator importante é a relação existente entre a epidemia de AIDS e a disseminação da shigelose em países em desenvolvimento. A imunodeficiência associada ou não ao HIV pode levar a manifestações clínicas mais graves da infecção por *Shigella*, incluindo doença intestinal persistente ou recorrente e bacteremia. Entretanto, infecções extraintestinais por *Shigella* são raras (KRISTJÁNSSON *et al.*, 1994; NIYOGI, 2005).

Como no caso de outras infecções entéricas, as formas de prevenção da doença são, basicamente, utilização de água tratada, saneamento básico e cuidados de higiene pessoal e dos alimentos. Medidas de educação sanitária simples, porém eficientes, são essenciais, considerando-se a dose infectante baixa e o potencial de disseminação da bactéria (WHO/CDS/SR/DRS/2001.8, 2001; SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005).

Ainda não foi desenvolvida uma vacina eficaz contra a shigelose. Avanços biotecnológicos e no conhecimento sobre mecanismos moleculares de virulência do microrganismo vêm permitindo o surgimento de uma nova geração de candidatos a vacina e o aprimoramento de processos para sua obtenção. Entre eles, está a inativação de enterotoxinas por meio de engenharia genética.

Combinções de sorotipos atenuados, principalmente *S. flexneri* 2a e *S. dysenteriae*, também estão sendo considerados. A possibilidade de desenvolvimento de uma vacina é sustentada por várias evidências que indicam que a infecção por *Shigella* confere imunidade. Em áreas endêmicas, a incidência elevada de shigelose durante os cinco primeiros anos de vida seguida de seu declínio sugere que a imunidade desenvolve-se após exposições sucessivas durante a infância (WHO, 1997; WHO/V&B/99.26, 1999; SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005, WHO/IVB/06.05, 2006).

Assim como para outros agentes, a diarreia associada a *Shigella* é uma doença autolimitada e a base do tratamento é a reidratação. A indicação de antibioticoterapia depende de diversos fatores, como gravidade do quadro, condições imunológicas do paciente e probabilidade de transmissão da infecção. Estudos vêm demonstrando que o uso de antimicrobianos pode reduzir o período de manifestação da doença e de excreção da bactéria (WHO/CDS/SR/DRS/2001.8, 2001; NIYOGI, 2005; SHAKOO *et al.*, 2012).

Uma grande variedade de drogas antimicrobianas tem se mostrado eficaz para o tratamento de indivíduos com shigelose, embora as opções terapêuticas tenham diminuído devido à emergência de linhagens resistentes. Deve-se ressaltar que fatores socioeconômicos e comportamentais contribuem para o aumento das taxas de resistência a antimicrobianos. O tratamento inadequado de pacientes com doenças infecciosas, muitas vezes resultado do consumo de antibióticos sem prescrição médica, especialmente em países menos desenvolvidos, contribui para a seleção de microrganismos resistentes, inclusive membros da microbiota indígena. Então, os marcadores genéticos de resistência podem ser transferidos para amostras de *Shigella*, especialmente por conjugação (WHO/CDS/SR/DRS/2001.8, 2001).

1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

A maioria dos microrganismos da microbiota indígena de seres humanos habita o intestino, especialmente o cólon, onde já foi demonstrada a existência de cerca de 10^{11} células bacterianas por grama de conteúdo. Desta forma, o ecossistema intestinal é extremamente complexo, apresentando um número de células bacterianas 10 vezes maior que o número de células somáticas presentes no corpo humano (NICOLI & VIEIRA, 2004; LESER & MOLBAK, 2009; POSSEMIERS *et al.*, 2009; ROSS *et al.*, 2010). A diversidade deste ecossistema é tanta que o genoma de nossa microbiota intestinal contém pelo menos 100 vezes mais genes do que o próprio genoma humano (ROUND & MAZMANIAM, 2009). Além disto, o peso total da microbiota de um indivíduo adulto é estimado em 1,2 kg e sua atividade metabólica total é similar à do fígado. Células microbianas constituem um pouco mais de 40% das fezes úmidas (NICOLI & VIEIRA, 2004). Calcula-se que cerca de 1000 espécies bacterianas habitam o intestino de um indivíduo adulto saudável (BIK, 2009; HATTORI & TAYLOR, 2009; LESER & MOLBAK, 2009; SEKIROV & FINLAY, 2009; MARCHESI, 2010).

Nos últimos anos, tem-se percebido um interesse crescente na identificação dos membros da microbiota indígena de seres humanos e na compreensão de seu papel na manutenção da saúde do hospedeiro (SAULNIER *et al.*, 2009; CHUNG & KASPER, 2010; ROSS *et al.*, 2010). Com este intuito, foi criado o Projeto Microbioma Humano que, iniciado em 2007, tem por objetivo elucidar a complexa mistura e as interações entre os genes encontrados nos genomas humano e microbiano. A melhor compreensão das características do genoma do organismo hospedeiro e de sua microbiota, bem como suas interações, levará a abordagens individualizadas para a prevenção e o tratamento de doenças específicas (BLASER & FALKOW, 2009; LESER & MOLBAK, 2009; CHUNG & KASPER, 2010).

30

1.2.1 IMPLANTAÇÃO

Até pouco tempo, acreditava-se que o ser humano nascia estéril e adquiria sua microbiota após o nascimento, a partir do meio externo, principalmente da mãe (NICOLI & VIEIRA, 2004; BIK, 2009; BLASER & FALKOW, 2009; LESER & MOLBAK, 2009; ROSS *et al.*, 2010). Na última década, alguns autores passaram a defender a ideia de que a gravidez é o início da exposição dos seres humanos ao mundo microbiano. Bactérias que colonizam o intestino e a região urogenital da mãe, como espécies de *Enterococcus* e *Lactobacillus*, já foram detectadas no sangue do cordão umbilical, fluido amniótico, mecônio, placenta e membrana fetal, sem nenhuma evidência clínica de infecção ou inflamação (THUM *et al.*, 2012). Nesta linha de pensamento, temos trabalhos que procederam ao isolamento de microrganismos (JIMÉNEZ, *et al.*, 2005; PETTKER, *et al.*, 2007; JIMÉNEZ *et al.*, 2008) e outros que identificaram a presença de material genético em amostras biológicas relacionadas ao feto (STEEL *et al.*, 2005; SATOKARI *et al.*, 2009).

Nas primeiras semanas após o nascimento, a microbiota intestinal é constituída por um número limitado de espécies bacterianas e um perfil microbiano instável. De maneira geral, bactérias anaeróbias facultativas (como *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*) são as pioneiras, colonizando o trato digestivo nas primeiras 12 horas de vida. Após dois ou três dias, com a diminuição da concentração de oxigênio disponível no local, a densidade populacional do intestino decresce e bactérias anaeróbias obrigatórias (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Clostridium*) passam a ser observadas no ecossistema. A diversidade e a estabilidade microbiana crescem com a idade e o perfil microbiano das fezes de uma criança com um ano de vida já se assemelha ao de um indivíduo adulto, apresentando *Bacteroides* e *Firmicutes* como os táxons mais abundantes (NICOLI & VIEIRA, 2004; PALMER *et al.*, 2007; BIK, 2009). A dieta tem grande influência no estabelecimento da microbiota nos primeiros meses de vida, seja na composição, seja na diversidade. Bebês alimentados com leite materno, por exemplo, desenvolvem uma microbiota mais heterogênea e com maior diversidade de táxons que bebês que foram

alimentados com fórmula (OTTMAN *et al.*, 2012; SHWARTZ *et al.*, 2012; THUM, *et al.*, 2012).

1.2.2 COMPOSIÇÃO

5

Vários são os fatores que afetam a colonização microbiana ao longo da vida do indivíduo, dentre eles, tipo de parto, se a criança nasceu prematura ou não, alimentação, composição genética e uso de antimicrobianos (NICOLI & VIEIRA, 2004; BLASER & FALKOW, 2009; LESER & MOLBAK, 2009; ROSS *et al.*, 2010; SEKIROV *et al.*, 2010; TIIHONEN *et al.*, 2010; FLINT, 2012). Com o advento de técnicas de genética molecular e suas aplicações na análise de amostras fecais, o conhecimento a respeito da microbiota intestinal vem crescendo dramaticamente (ROBERFROID *et al.*, 2010). Conhecer as comunidades microbianas que colonizam o corpo humano ajuda no entendimento de como esta microbiota atua tanto na manutenção da saúde como no desenvolvimento de doenças (BIK, 2009).

A microbiota gastrointestinal indígena é extremamente dinâmica, apresentando alguns membros residentes (autóctones) e outros transitórios (alóctones), originados de água e alimentos ingeridos ou do ambiente (ROSS *et al.*, 2010). A composição da comunidade microbiana é específica, sendo influenciada por estímulos exógenos e endógenos (SEKIROV *et al.*, 2010). A colonização microbiana do trato gastrointestinal humano varia quantitativa, qualitativa e metabolicamente ao longo de sua extensão (NICOLI & VIEIRA, 2004; O'HARA & SHANAHAN, 2006; SEKIROV & FINLAY, 2009; TIIHONEN *et al.*, 2010). Fatores como pH, peristaltismo, disponibilidade de nutrientes, potencial de oxidorredução, idade e saúde do hospedeiro, adesão, cooperação e antagonismo bacteriano, secreção de mucinas e trânsito intestinal, influenciam a composição quantitativa e qualitativa da microbiota de diferentes regiões do trato gastrointestinal (KERCKHOFFS *et al.*, 2006; ROBERFROID *et al.*, 2010; OTTMAN *et al.*, 2012). Evidências mostram que o sistema imunológico também é um importante contribuinte no controle da composição da microbiota (HOOPER *et al.*, 2012).

A microbiota do esôfago é similar àquela da cavidade oral, apresentando *Streptococcus*, *Prevotella* e *Veillonella* como os grupos mais prevalentes (PEI *et al.*, 2004; BIK, 2009). Já no estômago de adultos saudáveis, onde a concentração microbiana é relativamente baixa (cerca de 10^{1-2} UFC/mL), microrganismos tais como, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Enterococcus* e *Bacillus* podem ser detectados. Neste sítio, *Helicobacter pylori* merece destaque, devido à sua associação com infecção gástrica (REUTER, 2001; DiBAISE *et al.*, 2008; BIK, 2009; ROBERFROID *et al.*, 2010; SEKIROV *et al.*, 2010).

No intestino delgado, a concentração microbiana é maior (10^{2-7} UFC/mL), sendo observadas bactérias incluídas nos filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (KERCKHOFFS *et al.*, 2006; TAPPENDEN, 2007; ROBERFROID *et al.*, 2010; TIIHONEN *et al.*, 2010). Ao longo do órgão, à medida que o peristaltismo intestinal, o pH e o potencial de oxidorredução diminuem, a densidade populacional aumenta (KERCKHOFFS *et al.*, 2006).

O intestino grosso, por sua vez, é o órgão que apresenta a maior concentração microbiana (10^{10-12} UFC/mL) de todo o corpo humano (DiBAISE *et al.*, 2008; LESER & MOLBAK, 2009; POSSEMIERS *et al.*, 2009; ROSS *et al.*, 2010; TIIHONEN *et al.*, 2010). A combinação entre o aumento do tempo de trânsito intestinal, a disponibilidade de nutrientes (bolo alimentar não digerido, *debris* de células microbianas e epiteliais, subprodutos do metabolismo microbiano, dentre outros) e o pH próximo ao neutro, torna o intestino grosso um ambiente altamente favorável para a colonização microbiana. Como o ambiente é, predominantemente, anaeróbio, prevalecem bactérias anaeróbias obrigatórias (ROBERFROID *et al.*, 2010). Neste órgão, três níveis populacionais distintos podem ser observados: (i) microbiota dominante (99% da população, 10^{9-11} UFC/g de conteúdo), constituída basicamente por bactérias anaeróbias obrigatórias (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bifidobacterium*); (ii) microbiota subdominante (0,99% da população, 10^{7-8} UFC/g de conteúdo), predominantemente anaeróbia facultativa (*E. coli* e *E. faecalis*); e (iii) microbiota residual (0,01% da população, $< 10^7$ UFC/g de conteúdo), incluindo uma grande variedade de microrganismos procarióticos (outras enterobactérias, *Pseudomonas* e *Bacillus*) e eucarióticos (leveduras e protozoários). A microbiota

residual é bastante variável de um indivíduo para outro e flutua consideravelmente ao longo do tempo em um mesmo indivíduo (NICOLI & VIEIRA, 2004).

1.2.3 RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO

5

A imagem tradicional de que todos os microrganismos são causadores de doenças foi substituída pela visão de que a maioria das interações microrganismo-hospedeiro é não-patogênica, comensal ou mutualística (DETHLEFSEN *et al.*, 2007; BIK, 2009). Estas interações simbióticas coevoluem.

10 As bactérias que constituem a microbiota intestinal desempenham uma série de funções relevantes, como digestão e síntese de nutrientes, metabolismo de drogas, síntese de vitaminas, desenvolvimento epitelial e maturação do sistema imunológico. Merece destaque o papel de defesa da microbiota intestinal, o chamado efeito barreira, que protege o hospedeiro contra a colonização por

15 bactérias exógenas que, diariamente, têm acesso ao órgão. Em troca, recebem os benefícios de um *habitat* com fluxo constante de nutrientes (TAPPENDEN & DEUTSCH, 2007; BIK, 2009; LESER & MOLBAK, 2009; SAULNIER *et al.*, 2009; CHUNG & KASPER, 2010; ROSS *et al.*, 2010; HOOPER, *et al.*, 2012). O destino evolutivo compartilhado entre seres humanos e suas bactérias simbióticas foi

20 selecionado no sentido de interações mutualísticas que são essenciais para a saúde humana. Mudanças, ecológicas ou genéticas, que dissociam este relacionamento podem resultar em distúrbios na saúde do hospedeiro (DETHLEFSEN *et al.*, 2007; HOOPER *et al.*, 2012). Desta forma, desvios do desenvolvimento normal da microbiota, influenciados, por exemplo, por tipo de

25 parto e de dieta, condições de higiene, vacinação e uso de antimicrobianos na infância, podem interferir no desenvolvimento do sistema imunológico e predispor indivíduos a vários distúrbios inflamatórios no decorrer da vida (NICOLI & VIEIRA, 2004; ROUND & MAZMANIAN, 2009; OTTMAN *et al.*, 2012; SCHOLTENS *et al.*, 2012; SHANAHAN, 2012).

30

É importante ressaltar a relevância do papel metabólico da microbiota intestinal para o organismo humano. Ela é responsável, por exemplo, pela quebra de toxinas alimentares e substâncias cancerígenas, síntese de nutrientes, fermentação de substâncias alimentares indigestas e auxílio na absorção de

certos eletrólitos e sais minerais. Além disso, evidências recentes sugerem que a microbiota intestinal aumenta a absorção de nutrientes pelo intestino, afetando, desta forma, a regulação energética. Acredita-se, por exemplo, que as atividades metabólicas da microbiota intestinal facilitam a extração de calorias de substâncias alimentares ingeridas e ajudam a armazenar estas calorias no tecido adiposo do hospedeiro. Já foi demonstrado que a microbiota intestinal de ratos e de seres humanos obesos inclui, proporcionalmente, menos *Bacteroidetes* e mais *Firmicutes* que aquela de indivíduos magros, sugerindo que as diferenças na extração de substâncias calóricas do alimento ingerido podem ser devidas à composição da microbiota intestinal (MARCHESI & SHANAHAN, 2007; DiBAISE *et al.*, 2008; TILG *et al.*, 2009; VENEMA, 2010; VRIEZE *et al.*, 2010). Embora dados referentes a seres humanos ainda sejam preliminares, alguns achados reforçam o conceito de que a microbiota intestinal, juntamente com o genótipo e o estilo de vida do hospedeiro, podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade (TILG *et al.*, 2009).

A microbiota intestinal também influencia o desenvolvimento do sistema nervoso central e o comportamento. Em animais adultos, a composição global da microbiota e a presença de amostras bacterianas específicas podem modular a função neural. Alguns dos possíveis mecanismos pelos quais as bactérias influenciam o comportamento do hospedeiro incluem os produtos bacterianos que ganham acesso ao cérebro via corrente sanguínea e área postrema, via liberação de citocinas a partir de células do sistema imune das mucosas, via liberação de hormônios intestinais ou via dos aferentes neurais, incluindo o nervo vago. Por sua vez, estresse e emoções podem influenciar a composição microbiana do intestino, por intermédio da liberação de hormônios do estresse ou neurotransmissores simpáticos, que influenciam a fisiologia intestinal e alteraram o *habitat* da microbiota. Os hormônios do estresse, como a noradrenalina, podem influenciar a expressão de genes bacterianos ou a sinalização entre bactérias e isto pode alterar a composição e a atividade microbiana (COLLINS *et al.*, 2012; FORSYTHE *et al.*, 2012).

É importante destacar, ainda, que estudos comparativos demonstraram que a presença de microrganismos é um fator fundamental para o desenvolvimento do próprio intestino e do sistema imunológico. Durante o

desenvolvimento infantil (e também na idade adulta), bactérias do intestino modelam tecidos, células e perfil molecular do sistema imune gastrointestinal. Esta parceria, presente por milênios de coevolução, é baseada na troca molecular, envolvendo sinais bacterianos que são reconhecidos por receptores do hospedeiro (KELLY *et al.*, 2007; LEE & MAZMANIAN, 2010). O estado permanente de *inflamação fisiológica* presente no intestino é fundamental para a defesa do hospedeiro contra o influxo constante de patógenos potenciais e contra a própria microbiota indígena (SAULNIER *et al.*, 2009; CHUNG & KASPER, 2010; ROSS *et al.*, 2010).

Além de desenvolver o sistema imunológico, a microbiota intestinal fornece ao hospedeiro uma barreira biológica contra microrganismos patogênicos, por competição: ela ocupa sítios de adesão, consome nutrientes, estimula a produção de mucina e de peptídeos antimicrobianos pelo intestino, estabiliza a barreira da mucosa intestinal, melhora a motilidade intestinal e produz substâncias antimicrobianas (STECHEER *et al.*, 2008; SEKIROV *et al.*, 2010). Desta forma, a barreira promovida pela microbiota residente impede a colonização por microrganismos patogênicos, como os patótipos diarreiogênicos de *E. coli*, *Clostridium*, *Salmonella* e *Shigella* (DiBAISE *et al.*, 2008; SRIKANTH & McCORMICK, 2008). Merece menção, ainda, que algumas bactérias indígenas, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, são consideradas exemplos de promotores de saúde. Elas podem ajudar na digestão de lactose em indivíduos intolerantes a este açúcar, reduzir a ocorrência de casos de diarreia e contribuir para a resistência a infecções (LESER & MOLBAK, 2009; SAULNIER *et al.*, 2009).

Assim sendo, a microbiota está intimamente envolvida em vários aspectos relacionados à manutenção da homeostasia do hospedeiro. Entretanto, ela também pode ser considerada causa direta ou contribuinte de diversas doenças, tais como obesidade, alergia, diabetes tipo 1, febre familiar do mediterrâneo e autismo. É importante salientar que existem evidências de que bactérias da microbiota intestinal não somente transferem genes de resistência a drogas antimicrobianas entre si, mas, também, podem interagir com bactérias transitórias, incluindo patógenos, que podem participar dos processos de recombinação genética (SEKIROV *et al.*, 2010).

1.3 BACTERIOCINAS

Vários microrganismos produzem uma ampla variedade de compostos que apresentam propriedades antimicrobianas (LINE *et al.*, 2008). Pesquisadores sempre demonstraram grande interesse por estas substâncias, seja pela possibilidade de aplicação prática, seja para o entendimento das relações microbianas.

Assim como inúmeros achados importantes da Microbiologia, foi Pasteur, juntamente com Joubert, quem primeiramente descreveu, em 1877, interações antagônicas entre bactérias. Embora trabalhos atuais comprovando estes resultados sejam raros, eles observaram que amostras de *E. coli* isoladas de urina eram capazes de inibir a multiplicação de *Bacillus anthracis* (JACK *et al.*, 1995). Desde então, várias substâncias antagonistas sintetizadas por uma ampla gama de bactérias, sejam elas Gram negativas ou Gram positivas, foram descritas. Aquelas produzidas por bactérias do ácido láctico e por enterobactérias são as mais bem estudadas e melhor caracterizadas em relação a estrutura, função e mecanismo de ação (CURSINO *et al.*, 2002; RILEY & WERTZ, 2002; CASCALES *et al.*, 2007).

Bacteriocinas, termo inicialmente proposto por Jacob e colaboradores (1953), são substâncias antagonistas produzidas por bactérias, com fração proteica biologicamente ativa, capazes de matar ou inibir a multiplicação, especialmente, de bactérias filogeneticamente relacionadas à amostra produtora. Carboidratos e lipídios podem fazer parte da estrutura destas moléculas (REEVES, 1965; GOVAN, 1986; JACK *et al.*, 1995; DAW & FALKINER, 1996; AVELAR *et al.*, 1999; RILEY & WERTZ, 2002; BATDORJ *et al.*, 2006; RIBEIRO-RIBAS *et al.*, 2009). A produção de bacteriocinas é codificada por plasmídios ou cromossomos e sua atividade é iniciada pela ligação a receptores específicos presentes na superfície de células sensíveis (GOVAN, 1986). Esta família de proteínas abrange grande diversidade de moléculas, no que se refere a tamanho, alvo microbiano, modo de ação e mecanismo de imunidade. Elas diferem dos antibióticos tradicionais pela sua natureza proteica e por apresentarem um

espectro de ação relativamente limitado (REEVES, 1965; RILEY & WERTZ, 2002).

A produção de bacteriocinas já foi observada para grande parte dos membros dos domínios Bacteria e Archaea (TORRE BLANCA *et al.*, 1989; RILEY, 1998; O'CONNOR & SHAND, 2002) e, de acordo com Klaenhammer (1993), 99% das bactérias produzem pelo menos uma bacteriocina e a única razão pela qual mais substâncias desta natureza ainda não foram isoladas é a escassez de estudos na área. Algumas destas substâncias, tais como as halocinas, produzidas pelas halobactérias (Archaea), apresentam uma sequência diferente de todas as outras bacteriocinas já descritas (SHAND *et al.*, 1998). Por outro lado, outras bacteriocinas, tais como piocinas, colicinas, cloacinas, klebocinas e marcescinas, sintetizadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, respectivamente, compartilham sequências proteicas (RILEY, 1998).

15

1.3.1 PAPEL DAS BACTERIOCINAS

Sabe-se que os microrganismos investem energia considerável na elaboração de compostos antimicrobianos. Entretanto, não está claro como esta diversidade surgiu e quais os papéis que estas substâncias desempenham nas comunidades microbianas (RILEY & WERTZ, 2002). Com relação às colicinas, por exemplo, embora pesquisas tenham gerado grande volume de informações relacionadas à genética molecular, modo de ação e aplicações, pouco se sabe sobre o papel que elas efetivamente desempenham nas relações ecológicas entre microrganismos (DYKERS & HASTINGS, 1997; CURSINO *et al.*, 2002). Alguns autores sugerem que as bacteriocinas exerçam papel importante nas interações entre bactérias, contribuindo para a dinâmica populacional e para a manutenção do balanço ecológico da microbiota indígena. Bactérias produtoras de bacteriocinas já foram isoladas de inúmeras regiões do organismo, como cavidade oral, intestino e diversas outras superfícies epiteliais (OLIVEIRA *et al.*, 1998; AVELAR *et al.*, 1999; PADILLA *et al.*, 2004; APOLÔNIO *et al.*, 2007; APOLÔNIO *et al.*, 2008; LINE *et al.*, 2008; RIBEIRO-RIBAS *et al.*, 2009).

As bacteriocinas parecem desempenhar papel significativo no controle de infecções bacterianas (RILEY, 1998). Segundo Riley e Wertz (2002), bacteriocinas podem favorecer a invasão de uma comunidade bacteriana estável por uma amostra bacteriana produtora ou, inversamente, impedir o estabelecimento de amostras bacterianas sensíveis em um sítio colonizado por linhagens produtoras de bacteriocinas. Contudo, segundo Joerger (2003), a produção e a atividade das bacteriocinas vêm sendo demonstradas, na maioria dos casos, somente em laboratório e as evidências do papel das mesmas em sistemas naturais são apenas circunstanciais.

Em termos Darwinianos, a produção de bacteriocina pode ser considerada vantajosa, uma vez que promove a eliminação de uma bactéria filogeneticamente relacionada e, possivelmente, competidora. Por outro lado, a conservação de receptores para bacteriocinas parece ser um fator de suicídio, considerando que sua presença favorece a morte celular (GOVAN, 1986).

1.3.2 APLICAÇÕES DAS BACTERIOCINAS

Como um antimicrobiano em potencial, as bacteriocinas despertam grande interesse dos pesquisadores. Algumas destas moléculas ocorrem naturalmente em alimentos, são estáveis a baixos valores de pH e ao calor, são simples de produzir e extrair, geralmente apresentam baixa ou nenhuma toxicidade contra células eucarióticas, podem ser produzidas *in situ*, por probióticos, ou por bioengenharia, o que as tornam candidatas atrativas para aplicação na indústria alimentícia e agropecuária ou como alternativa aos antibióticos (SIT & VEDERES, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2011; COTTER *et al.*, 2013).

Lantibióticos, como nisina e lacticina, são amplamente utilizados como agentes conservantes em carne e produtos lácteos (CHATTERJEE *et al.*, 2005). Além disto, cientistas estudam alimentos contendo microrganismos produtores de bacteriocinas, com o objetivo de fornecer proteção contra infecções intestinais graves (KRIKUP, 2006; GILLOR *et al.*, 2008). O emprego de bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas também vêm sendo considerado nas práticas de

aquicultura (GILLOR *et al.*, 2008). A princípio, a utilização de bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas é interessante, uma vez que estas substâncias i) confeririam vantagem ao microrganismo probiótico na competição contra a microbiota residente, ii) poderiam eliminar diretamente bactérias patogênicas e iii) funcionariam como peptídeo de sinalização, mediando a comunicação com outras bactérias ou a interação com o sistema imune do hospedeiro (DOBSON *et al.*, 2011).

Outras aplicações já foram sugeridas para as bacteriocinas. Elas demonstraram utilidade, por exemplo, em estudos epidemiológicos. Neste caso, a tipagem, importante na investigação de surtos de doenças infecciosas, pode ser feita de duas maneiras: i) por meio da determinação da produção de bacteriocina contra uma série de amostras indicadoras conhecidas e ii) por intermédio da determinação da sensibilidade a bacteriocinas produzidas por amostras padrão (DAW & FALKINER, 1996).

Avanços também já foram feitos com relação às aplicações médicas das bacteriocinas. O antibiótico lacticina 3147, por exemplo, apresenta atividade importante contra amostras virulentas de bactérias, como MRSA e VRE (GALVIN *et al.*, 1999; MARTIN *et al.*, 2004; SIT & VEDERES, 2008). Outro estudo demonstra a inibição da infecção da conjuntiva por *S. sonnei* pela ação de amostras de *E. coli* produtoras de colicinas (STREELMAN *et al.*, 1970). Já foi demonstrada, também, a prevenção da colonização de cateteres urinários por amostras produtoras de colicinas (TRAUTNER *et al.*, 2005).

É importante destacar, ainda, a existência de estudos nos quais a citotoxicidade de colicinas é empregada para matar linhagens de células cancerosas eucarióticas. Foi demonstrado que colicinas podem inibir a proliferação de células cancerosas, animais e humanas, e, desta forma, ser potencialmente exploradas no combate ao câncer. Estudos também mostram que as colicinas são mais tóxicas para células tumorais do que para células normais no organismo e que não apresentam efeito tóxico para animais testados em laboratórios (LANCASTER *et al.*, 2007).

1.3.3 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E ARCHAEA

As bacteriocinas de bactérias Gram positivas são, geralmente, catiônicas, anfifílicas, promotoras da permeabilização de membrana plasmática e possuem
5 massa molecular entre 2 e 6 kDa (HENG *et al.*, 2007; PAPAGIANNI & ANASTASIADOU, 2009). Segundo revisão elaborada por Gillor e colaboradores (2008), diferentemente do que se observa para bactérias Gram negativas, a produção de bacteriocinas por bactérias Gram positivas não é necessariamente letal para a célula produtora, sendo, esta propriedade, regulada de forma
10 específica. A produção de bacteriocinas está, geralmente, associada à mudança da fase log para a fase estacionária de crescimento e a regulação da expressão da propriedade depende da densidade da cultura (DUFOUR *et al.*, 2007; GILLOR *et al.*, 2008). As bactérias Gram positivas são encontradas em vários ambientes competitivos, o que influenciou a habilidade de síntese de uma gama diversificada
15 de bacteriocinas com características estruturais únicas e com diversos modos de ação (GARNEAU *et al.*, 2002).

Geralmente, a produção de bacteriocinas por bactérias Gram positivas requer mais de um gene. Estes genes são, normalmente, codificados por plasmídios, embora, para algumas bacteriocinas, também possam ser
20 encontrados em cromossomos ou em transpósons (GILLOR *et al.*, 2008).

As bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico são as mais bem caracterizadas deste grupo e, habitualmente, apresentam efeito em concentrações muito pequenas, nanomolares (GILLOR *et al.*, 2008; LINE *et al.*, 2008; SIT & VEDERAS, 2008; PAPAGIANNI & ANASTASIADOU, 2009). Elas são
25 utilizadas na preservação de alimentos e seu espectro inibitório é, muitas vezes, restrito a bactérias Gram positivas, mas, podem, mesmo assim, ser ativas contra microrganismos patogênicos e que causam a deteriorização de alimentos, como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* (RILEY, 1998).

30 As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas podem ser divididas em quatro classes, com base nas propriedades físico-químicas e estruturais. A classe I abrange pequenas bacteriocinas modificadas, os lantibióticos. Resíduos de lantionina ou β -metil lantionina formam pontes covalentes entre os aminoácidos,

resultando em anéis internos que conferem aos lantibióticos suas características estruturais. A classe II agrupa pequenas bacteriocinas catiônicas, hidrofóbicas, não modificadas e estáveis ao calor. A classe III inclui grandes moléculas de bacteriocinas resistentes ao calor, que catalisam a hidrólise da parede celular de células sensíveis. A classe IV, por sua vez, inclui bacteriocinas complexas, contendo lipídios e carboidratos em suas estruturas moleculares. Pouco se sabe sobre sua estrutura e função (KLAENHAMMER, 1993; RILEY & WERTZ, 2002; COTTER *et al.*, 2005; GILLOR *et al.*, 2008; PAPAGIANNI & ANASTASIADOU, 2009; RILEY, 2009; NICHIE *et al.*, 2012).

Nisina, o lantibiótico produzido por *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem estudada e caracterizada. É a única em uso comercial generalizado nos grandes países produtores de alimentos. Seu sucesso levou vários grupos de pesquisadores a procurarem por novas amostras produtoras de bacteriocinas nos últimos anos. Considerando que preservação química de alimentos está sendo constantemente questionada em relação a segurança, o potencial de aplicação práticas destas bacteriocinas é grande, uma vez que bactérias do ácido láctico e seus metabólitos são geralmente aceitos pelos consumidores como algo natural e promotor de saúde (PAPAGIANNI & ANASTASIADOU, 2009).

Não somente os procariotos, mas também os membros do grupo Archaea produzem bacteriocinas, as arqueocinas. Os compostos proteicos antimicrobianos produzidos por vários membros halófilos extremos do domínio Archaea, denominados halocinas, foram inicialmente descritos em 1982. Tempos depois, a produção destas substâncias também foi relatada para o organismo hipertermófilo *Sulfolobus islandicus* (sulfolobcina). De forma geral, as arqueocinas são estáveis a temperaturas elevadas (O'CONNOR & SHAND, 2002; SHAND & LEYVA, 2007).

As arqueocinas são produzidas quando as células atingem a fase estacionária. Quando os recursos são limitados, as células produtoras lisam as células sensíveis, enriquecendo nutricionalmente o ambiente. Como são proteínas estáveis, as arqueocinas podem permanecer no ambiente por tempo suficiente para reduzir a competição durante as fases subsequentes de fluxo de nutrientes. Além disto, esta estabilidade ajuda a explicar a baixa diversidade de espécies em ambientes hipersalinos (SHAND & LEYVA, 2007; RILEY, 2009).

1.3.4 COLICINAS E MICROCINAS

O termo colicina, cunhado em 1925 por Gratia, é utilizado para designar bacteriocinas produzidas por *E. coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae. As colicinas são as bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas mais bem estudadas, servindo, atualmente, como modelo para investigação da estrutura, função, organização genética, ecologia e evolução das bacteriocinas em geral (CASCALES *et al.*, 2007; GILLOR *et al.*, 2008). Dentre os gêneros de Enterobacteriaceae, já foi demonstrada a produção de colicinas e/ou microcinas para *Escherichia*, *Shigella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Yersinia* (CURSINO *et al.*, 2002; ELPEK, *et al.*, 2003; CHAVAN & RILEY, 2007).

Até o momento, mais de 30 colicinas já foram descritas, sendo que 21 estão bem caracterizadas, a saber: colicinas A, B, D, E1 a E9, Ia, Ib, JS, K, M, N, U, 5 e 10 (HINS DILL & GOEBEL, 1966; SMAJS *et al.*, 1997; MALES & STOCKER *et al.*, 1982; SMARDA & SMAJS, 1998; CURSINO *et al.*, 2002; DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2002; CASCALES *et al.*, 2007). Estas substâncias apresentam massa molecular entre 40 e 80 kDa. Bacteriocinas que possuem massa molecular mais baixa (até 10 kDa) são denominadas microcinas (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2002; CASCALES *et al.*, 2007).

As microcinas apresentam características em comum com as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas, como termoestabilidade, resistência a algumas proteases, hidrofobicidade relativa, resistência a valores extremos de pH e o mesmo modo de regulação (BAQUERO & MORENO, 1984; GILLOR *et al.*, 2004; CHAVAN & RILEY, 2007; GILLOR *et al.*, 2008). Aproximadamente 14 microcinas já foram descritas, sendo que apenas sete foram bem caracterizadas (DUQUESNE *et al.*, 2007a; GILLOR *et al.*, 2008). Elas apresentam grande diversidade estrutural, o que torna difícil a divisão em subclasses (DUQUESNE *et al.*, 2007b).

As colicinas podem ser codificadas por dois tipos diferentes de plasmídios. O plasmídio tipo A é pequeno (6 a 10 kb), presente em grande número de cópias na célula e mobilizado na presença de plasmídio conjugativo. O plasmídio tipo B, por sua vez, é relativamente grande (40 kb), carrega vários

genes e está apto a promover conjugação (PULGSLEY & OUDEGA, 1987; CURSINO *et al.*, 2002; GILLOR *et al.*, 2008).

5 A cadeia peptídica das colicinas pode ser dividida em três domínios funcionais independentes, cada um responsável por uma etapa da interação entre a substância e a célula sensível. O domínio central está envolvido na ligação entre a colicina e o receptor proteico específico na superfície celular. O domínio N-terminal é responsável pela passagem da colicina para dentro da célula alvo. O domínio C-terminal, por sua vez, exerce a função antimicrobiana propriamente dita (SMAJS *et al.*, 1997; SMAJS & WEINSTOCK, 2001; CURSINO *et al.*, 2002; 10 CASCALES *et al.*, 2007).

Segundo revisão elaborada por Gillor e colaboradores (2008), a frequência de produção de uma ou mais bacteriocinas em populações de *E. coli* pode variar de 10 a 80%, dependendo do hospedeiro do qual a amostra bacteriana foi isolada, da sua dieta, de mudanças temporais e do tipo de colicina 15 produzida.

As colicinas são liberadas pela lise da célula produtora e são dependentes das vias regulatórias das células hospedeiras, principalmente sistema SOS, ao contrário das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas, que apresentam autorregulação e um mecanismo de transporte 20 específico. Em momentos de estresse (presença de fatores que agridem o DNA, aumento da densidade populacional e esgotamento de nutrientes, dentre outros), uma pequena proporção da população produtora de colicina é induzida. Observa-se a lise da célula produtora, liberação da colicina e, conseqüentemente, morte das células sensíveis vizinhas e das células produtoras lisadas (RILEY & WERTZ, 25 2002; RILEY, 2009).

As células produtoras de colicinas também produzem uma proteína de imunidade que promove proteção contra sua própria colicina. Geralmente, a característica é codificada por um *cluster* composto por três genes intimamente ligados: um gene da colicina (que codifica a proteína responsável pela atividade 30 antibacteriana), um gene da imunidade (que codifica uma proteína de imunidade específica) e um gene de lise (que codifica uma proteína de lise relacionada com a liberação da colicina). A proteína de imunidade reconhece a colicina e, geralmente, se liga à sua extremidade C-terminal, impedindo sua ação na célula

potencialmente produtora. Além da imunidade, a resistência à colicina pode surgir por alterações nos receptores da superfície celular que a mesma utiliza para acessar a célula ou por mudanças nos mecanismos de transporte utilizados para cruzar a membrana celular (RILEY, 1988; RILEY & GORDON, 1999; CURSINO *et al.*, 2002; RILEY & WERTZ, 2002).

O mecanismo de *suicídio*, no qual a bactéria produtora é lisada para liberação da colicina, gera um grande custo para a célula. A vantagem evolutiva deste mecanismo pode ser explicada por duas hipóteses: na primeira, as colicinas seriam usadas por plasmídios *egoístas*, para sua própria manutenção como *parasitas* de hospedeiros bacterianos. As células que perdessem os plasmídios também perderiam a imunidade e seriam mortas por células produtoras vizinhas. A segunda hipótese leva em consideração que as colicinas também são importantes na competição por nicho e recursos, uma vez que, como já mencionado, matam organismos filogeneticamente relacionados às células produtoras. (CHAVAN & RILEY, 2007). É importante salientar, ainda, que o custo associado com a produção de colicinas é um determinante importante para o balanço entre as populações celulares produtoras, resistentes ou sensíveis às mesmas. Esta relação é semelhante ao jogo *pedra, papel, tesoura*, em que as células produtoras vencem as sensíveis, as células resistentes vencem as células produtoras e as células sensíveis vencem as células resistentes (GORDON *et al.*, 2007).

Uma vez liberadas no ambiente, as colicinas se ligam a receptores celulares específicos e são normalmente transportadas para dentro da célula (RILEY & GORDON, 1999). Elas podem ser divididas em dois grupos, dependendo da forma como entram ativamente nas células sensíveis. Colicinas do grupo A são translocadas através da membrana celular utilizando o sistema de transporte Tol, que consiste nas proteínas TolA, TolB, TolQ, TolR e Pal. Colicinas do grupo B, por sua vez, são translocadas por meio do sistema de transporte Ton, que consiste nas proteínas TonB, ExbB e ExbD (FIG. 2) (SMAJS *et al.*, 1997; SMAJS & WEINSTOCK, 2001; BRAUN *et al.*, 2002; CURSINO *et al.*, 2002; CASCALES *et al.*, 2007).

Quando no meio intracelular, podem apresentar um dentre três mecanismos de ação diferentes. O mecanismo mais frequentemente observado é

a formação de canais iônicos na membrana plasmática (formação de poro), o que resulta na despolarização da membrana. As colicinas A, B, E1, Ia, Ib, K, N, U, S4, 5 e 10 são conhecidas por agirem desta forma. Outro mecanismo é a ação nucleolase, que pode estar dirigida contra DNA cromossômico, RNA transportador ou RNA ribossômico. As colicinas D, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 e E9 apresentam este mecanismo de ação. Existe, ainda, embora em menor frequência, colicinas que hidrolisam a parede bacteriana ou impedem a formação do peptidoglicano e, conseqüentemente, promovem a lise celular. Este é o caso da colicina M (FIG. 2) (PUGSLEY, 1984; BRAUN *et al.*, 1994; RILEY & GORDON, 1999; CURSINO *et al.*, 2002; CASCALES *et al.*, 2007; RILEY, 2009).

1.3.4.1 PRODUÇÃO DE COLICINAS POR MEMBROS DO GÊNERO *Shigella*

A produção de colicinas por *S. sonnei*, *S. flexneri* e *S. boydii* já foi descrita. Entretanto, a maioria dos dados da literatura para membros do gênero *Shigella* abordam a caracterização de atividade antagonista como marcador epidemiológico (HINSDILL & GOEBEL, 1966; CHAN-TEOH *et al.*, 1971; MORRIS & WELLS, 1974; AMAKO *et al.*, 1978; MALES & STOCKER *et al.*, 1982; VLAJINAC & KRAJINOVIC, 1983; CASTILLO *et al.*, 1991; MERINO *et al.*, 2000; CURSINO *et al.*, 2002; SOUSA *et al.* 2010). Entre as colicinas sintetizadas por membros do gênero *Shigella*, merecem destaque as colicinas U e Js (SMAJS *et al.*, 1997; SMAJS & WEINSTOCK, 2001).

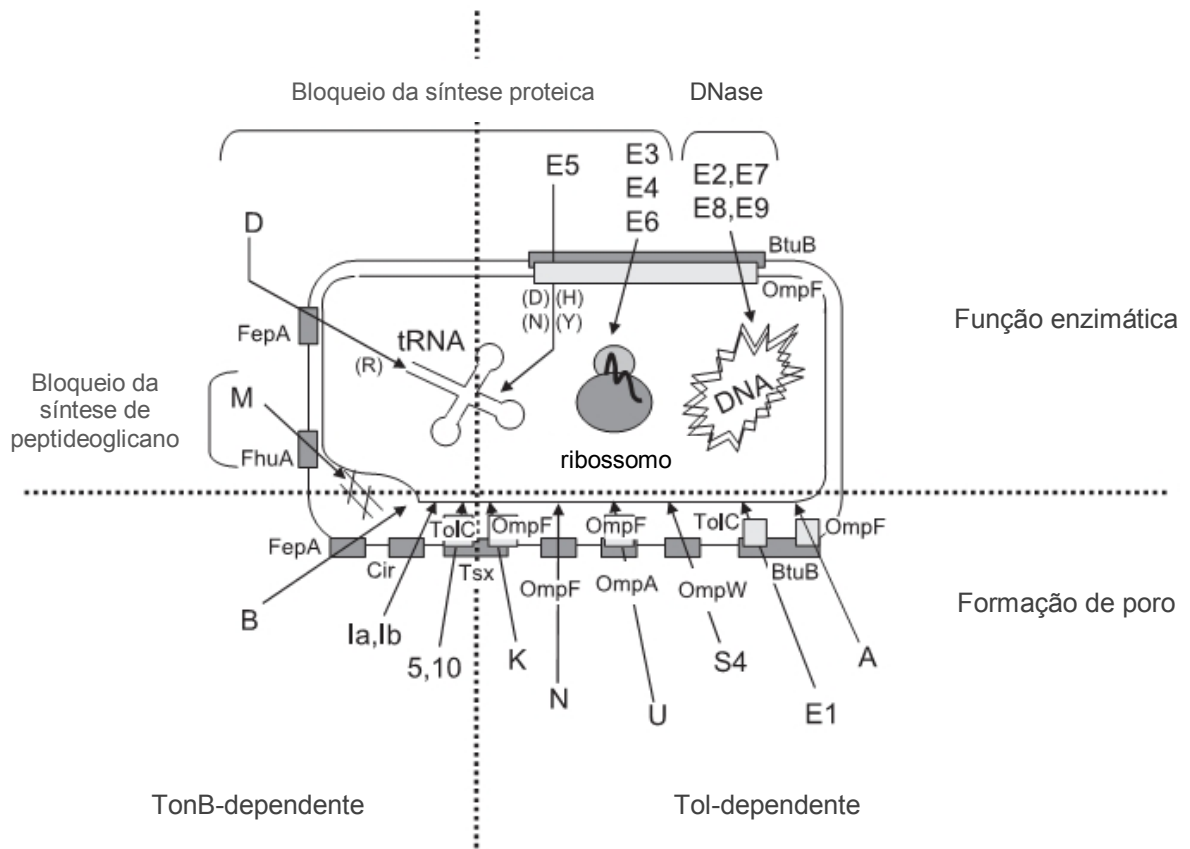


Figura 2. Representação esquemática da adesão, translocação e modo de ação das colicinas mais bem estudadas (modificado de CASCALES *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

5 Como previamente mencionado, bacteriocinas podem desempenhar papel importante nas relações ecológicas microbianas. Além disto, o tema vem recebendo grande atenção graças ao seu potencial promissor destas substâncias para a preservação de alimentos e como uma alternativa aos antibióticos clássicos empregados na medicina humana e veterinária. Tendo em mente a

10 importância das bacteriocinas nas relações entre microrganismos, a pesquisa e caracterização destas substâncias, especialmente daquelas produzidas por agentes etiológicos de doenças infecciosas, uma vez que a ação antimicrobiana pode ser considerada um fator de virulência, parece-nos relevante. Um estudo prévio com foco na pesquisa de atividade antagonista por *S. sonnei*, seguida de

15 avaliação da natureza do antagonismo e da caracterização preliminar de uma bacteriocina detectada nos motivaram a propor este projeto. A grande importância da enterite infecciosa aguda, a relevância de *S. sonnei* como agente da doença e a escassez de estudos relativos à caracterização de colicinas produzidas pelo microrganismo justificam esta proposta, que visa contribuir para o conhecimento

20 básico relativo a bacteriocinas sintetizadas por *S. sonnei*.

3. OBJETIVOS

5 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar uma bacteriocina produzida por uma amostra de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com diarreia aguda.

10

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

15

- Extrair as proteínas das frações extracelulares e intracelulares da amostra produtora de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com diarreia aguda.

- Confirmar a atividade antagonista das frações C30, C75 e S75.

20

- Titular a atividade antagonista e dosar as proteínas da fração C75.

- Avaliar o espectro de atividade antagonista da amostra produtora e das frações C30, C75 e S75 frente a uma ampla gama de amostras reveladoras.

25

- Avaliar a heterogeneidade populacional da amostra produtora em relação à característica *expressão de antagonismo*.

- Determinar a CIM, a CBM e a cinética de ação da fração C75.

- Purificar a(s) bacteriocina(s) presente(s) na fração C75.

- Titular a atividade antagonista e dosar as proteínas das frações originadas das cromatografias por troca iônica e exclusão molecular.

- Estimar a massa molecular da(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) na fração C75 e em frações parcialmente purificadas por SDS-PAGE empregando-se revelação *in situ*.
 - Determinar a massa molecular e a sequência de aminoácidos das proteínas presentes na fração ativa parcialmente purificada por espectrometria de massa.
- 5

4 MATERIAIS E MÉTODOS

5 4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Duas amostras de *S. sonnei* isoladas de espécimes fecais de crianças com diarreia aguda durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa “Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG e em Teresina/PI: estudo clínico e laboratorial” foram empregadas neste estudo, uma como produtora (SsP) e outra como reveladora (SsR) da atividade antagonista. Estas amostras foram identificadas por métodos bioquímico-fisiológicos, reações de aglutinação com antissoros específicos e PCR (NUNES *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013).

15 A amostra produtora foi selecionada entre 17 amostras de *S. sonnei* testadas quanto à produção de substâncias antagonistas contra um painel de bactérias da microbiota intestinal indígena e grupos diarreiogênicos. A amostra reveladora, selecionada para os testes de caracterização da bacteriocina, também foi previamente testada quanto à sua sensibilidade à atividade antagonista expressa pela amostra produtora (SOUSA, 2010; SOUSA *et al.*, 2010). As duas amostras pertencem à bacterioteca do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG.

25 Para avaliação do espectro de atividade antagonista da amostra produtora e de seus extratos proteicos C30, C75 e S75, foram utilizadas como reveladoras amostras da família Enterobacteriaceae [*Escherichia coli* (106), *Providencia* (11), *Proteus mirabilis* (53), *Citrobacter freundii* (52), *Citrobacter koseri* (38), *Klebsiella pneumoniae* (54), *Morganella morganii* (61), *Enterobacter* spp. (51), *Samonella enterica* (7), *Shigella sonnei* (34) e *Shigella flexneri* (19)] e bactérias anaeróbias obrigatórias [*Bifidobacterium* (10), *Bacteroides* (12), *Lactobacillus* (6) e *Fusobacterium* (4)], todas isoladas de seres humanos. Foram, ainda, empregadas as seguintes amostras de referência: *E. coli* ATCC 33591, *E. coli* K12 Row, *E. coli* ATCC 25922, EHEC CDC EDL 933, EIEC CDC EDL 1284,

EPEC CDC 0111 ab, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10557, *Streptococcus uberis* ATCC 9927, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* FDC Y4, *Eikenella corrodens* ATCC 23834, *Eubacterium lentum* ATCC 25559, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Porphyromonas gingivalis* FDC 381, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33569, *Prevotella melaninogenica* ATCC 24845, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25286, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Actinomyces israelii* ATCC 12102 e as leveduras *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, *Cryptococcus neoformans* ATCC 62066 e *Candida albicans* ATCC 18804.

15 Todas as amostras bacterianas pertencem à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e vêm sendo mantidas em Brucella Broth¹ acrescido de glicerol² a 10%, em freezer -80°C. As amostras de *Cryptococcus* foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências

20 Biológicas, UFMG) e a amostra de *Candida*, pelo Prof. Jacques Robert Nicoli (Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG).

25

4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES E INTRACELULARES

30 Para realização da extração proteica, foi utilizada metodologia já padronizada no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, com algumas adaptações (FARIAS *et al.*, 1994).

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Sciavico, Belo Horizonte, MG, Brasil

A amostra produtora criopreservada foi submetida a três repiques sucessivos em TSA³ e, então, cultivada em cinco tubos contendo 5 mL de TSB⁴ cada, por 24 h, a 37 °C, em atmosfera de aerobiose. Cada inóculo foi transferido para 145 mL de TSB e, após incubação por 12 h, a 37 °C, em aerobiose, sob
5 agitação constante, a cultura foi centrifugada a 12.520 x g, a 4 °C, por 30 min.

O *pellet* celular obtido foi lavado duas vezes com tampão Tris-HCl⁵ 0,01 M pH 8,0, centrifugado a 12.520 x g, a 4 °C, por 30 min e ressuspendido em 15 mL do mesmo tampão. Em seguida, a suspensão foi sonicada⁶, em banho de gelo, por 24 ciclos de 40 s cada, com intervalos de 40 s, em potência de 50%. A lise
10 celular foi confirmada por exame em microscópio óptico, após coloração pelo método de Gram. A fração sonicada resultante foi novamente centrifugada a 12.520 x g, a 4 °C, por 30 min. As proteínas do sobrenadante foram, então, precipitadas com sulfato de amônio⁷ em duas concentrações crescentes (0-30 e 30-75% p/v), sob agitação constante e lenta, em banho de gelo. Os precipitados
15 de cada fração foram coletados após centrifugação a 29.829 x g, a 4 °C, por 30 min, dissolvidos em aproximadamente 5 mL de tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 e dialisados (membranas de diálise de 12-16000 MW⁸) contra o mesmo tampão, por 24 h, a 4 °C, realizando-se três trocas de tampão. As frações intracelulares obtidas foram nomeadas C30 e C75.

As proteínas do sobrenadante proveniente da centrifugação da cultura da amostra produtora também foram precipitadas com sulfato de amônio em duas concentrações crescentes (0-30 e 30-75% p/v), sob agitação constante e lenta, em banho de gelo. Os precipitados de cada fração foram, após centrifugação a
20 23.741 x g, a 4 °C, por 30 min, dissolvidos em aproximadamente 5 mL de tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 e dialisados como descrito anteriormente. As frações
25 extracelulares obtidas foram nomeadas S30 e S75.

As frações C30, C75 e S75 foram testadas quanto ao espectro de atividade antagonista. Para os demais ensaios, a fração C75 foi selecionada, por

³ Difco, Sparks, MD, EUA

⁴ Difco

⁵ Promega, Madison, WI, EUA

⁶ Unique, Indaiatuba, SP, Brasil

⁷ Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

⁸ Viskase, Darien, IL, EUA

apresentar maior título de atividade antagonista, conforme estudo realizado previamente (OLIVEIRA, 2010).

5

4.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75

A atividade antagonista das frações C30, C75 e S75 foram confirmadas pelo método da sobrecamada (FREDERICQ, 1957; BOOTH *et al.*, 1977). Uma alíquota de 10 µL de cada extrato previamente esterilizado por filtração em membrana com poro de 0,22 µm⁹ foi gotejada sobre camada de TSA previamente vertido em placa de Petri. Após absorção do extrato, 3,5 mL de TSA semissólido (0,7% de ágar) acrescido de 10 µL de cultura da amostra de SsR foram vertidos sobre a camada de TSA. Como controle, o tampão de diluição das frações (Tris-HCl 0,01 M pH 8,0) foi testado. A avaliação de atividade antagonista foi realizada pela pesquisa da presença de zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora, após 24 h de incubação, a 37 °C, em aerobiose. Alíquotas dos extratos foram armazenadas em freezer -80 °C, para emprego nos testes subsequentes.

20

4.4 TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE C75

25

A fração C75 foi diluída sucessivamente em água Milli-Q^{®10} e empregada para avaliação de atividade antagonista, como descrito no item 4.3. O título, expresso em unidades arbitrárias de atividade antibacteriana por mililitro (UA/mL), foi definido como a recíproca da maior diluição que originou uma zona límpida de inibição da multiplicação da amostra reveladora (YAMAMOTO *et al.*, 2003).

30

⁹ Millex, Bedford, MA, EUA

¹⁰ Millipore, Molsheim, França

4.5 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DA AMOSTRA PRODUTORA E DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75

5 Os testes para avaliação de atividade antagonista empregaram a amostra produtora e as frações proteicas obtidas por precipitação com sulfato de amônio sabidamente ativas. Para cada amostra reveladora, uma placa de TSA foi dividida em quadrantes. Em um deles, foram gotejados 10 µL de cultura da amostra de *S. sonnei* produtora de bacteriocina. A placa foi incubada a 37 °C, em aerobiose.

10 Após 24 h, o *spot* bacteriano foi morto por exposição ao vapor de clorofórmio por 30 min. Em seguida, 10 µL das frações C30, C75 e S75 foram gotejados nos outros três quadrantes. Após absorção das alíquotas, meio semissólido acrescido da amostra reveladora (10 µL para amostras anaeróbias facultativas e 150 µL para anaeróbios obrigatórios e *A. actinomycesmcomitans*) foi vertido sobre a

15 camada de TSA. O meio utilizado foi selecionado de acordo com as exigências nutricionais do microrganismo indicador [TSA (aeróbios e anaeróbios facultativos), BHI¹¹ (anaeróbios obrigatórios e *A. actinomycesmcomitans*), MRS¹² (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) ou Sabouraud (leveduras)¹³]. O material foi incubado a 37 °C, por tempo e em atmosfera adequada para multiplicação da

20 amostra reveladora (48 h em anaerobiose, para as amostras anaeróbias obrigatórias e *A. actinomycesmcomitans* e 24 h em aerobiose para todas as demais). A leitura foi realizada pela avaliação da presença de halos de inibição da amostra reveladora, indicativos de atividade antagonista.

¹¹ Difco

¹² Difco

¹³ Merck, Darmstadt, Alemanha

4.6 AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE POPULACIONAL DA AMOSTRA PRODUTORA EM RELAÇÃO À CARACTERÍSTICA EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO

5

Diluições de uma cultura da amostra produtora SsP foram inoculadas em TSA, com o auxílio de alça de Drigalski, para obtenção de colônias isoladas. Após incubação a 37 °C, por 24 h, em aerobiose, as colônias de *S. sonnei* foram mortas por exposição ao vapor de clorofórmio por 30 min. Em seguida, TSA semissólido
10 acrescido de 10 µL da amostra reveladora foram vertidos sobre a camada de TSA e, após incubação nas mesmas condições especificadas acima, avaliou-se a expressão de antagonismo. *E. coli* K12 Row, *S. flexneri* ATCC 12022 e duas amostras de *S. sonnei* isoladas de pacientes com diarreia aguda, SsR (também empregada nos ensaios de caracterização da bacteriocina) e Ss, todas
15 sabidamente sensíveis à atividade antagonista expressa pela amostra produtora, foram empregadas como reveladoras. Cada amostra reveladora foi testada contra, pelo menos, 100 colônias da amostra produtora.

20

4.7 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE C75

4.7.1 DETERMINAÇÃO DA CIM

25

Uma alíquota da fração C75 com título de 102.400 UA/mL foi diluída sucessivamente em MH¹⁴, em placa de poliestireno com 96 poços. Obteve-se, então, em volume de 200 µL, diluições que variavam de 51.200 a 0,0001907 UA/mL. Em seguida, a amostra reveladora (cerca de 1,5 x 10⁵ UFC; 10 µL de
30 inóculo ajustado na escala McFarland 0,5 e diluído 1:10 em solução salina estéril) foi inoculada nos poços da placa de teste, exceto nos controles negativos. Foram utilizados dois controles negativos: i) MH acrescido de solução salina estéril e ii)

¹⁴ Difco

MH adicionado de extrato C75 diluído e salina estéril. Como controle positivo, foi utilizado MH acrescido do inóculo bacteriano. Após incubação *overnight*, a 37 °C, em aerobiose, procedeu-se à leitura. Todos os testes foram realizados em triplicata. A CIM foi definida como a menor concentração da substância antimicrobiana que inibiu o crescimento visível da amostra reveladora (FRENCH, 2006; LEVISON, 2000).

4.7.2 DETERMINAÇÃO DA CBM

10

A partir do resultado da CIM, determinou-se a CBM. Uma alíquota de 100 µL do material dos poços onde não houve crescimento visível da bactéria indicadora foi inoculada em TSA, com o auxílio de alça de Drigalski. O controle positivo foi diluído (10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7}) em salina estéril e, também, inoculado em TSA. Após incubação a 37 °C, por 24 h, em aerobiose, o número de UFC/mL foi estimado. Todos os testes foram realizados em triplicata. A CBM foi definida como a menor concentração da substância antimicrobiana capaz de reduzir a contagem bacteriana em 99,9% (LEVISON, 2000; FRENCH, 2006; VALEFF, 2011).

20

4.7.3 CINÉTICA DE AÇÃO

Para avaliação da cinética de ação, uma alíquota de C75 com título de 102.400 UA/mL foi diluída em MH até atingir a concentração equivalente à CIM. Alíquotas de 190 µL foram distribuídas em poços de placa de poliestireno e, em seguida, o inóculo da amostra reveladora foi acrescentado, como descrito no item 4.7.1. Em intervalos de 0, 5, 10, 20, 40 e 90 min, alíquotas de 100 µL foram retiradas e semeadas em TSA, com o auxílio de alça de Drigalski. O mesmo foi feito para os controles negativo e positivo, que foram preparados como descrito no item 4.7.1. Os testes foram realizados em triplicata. Após incubação a 37 °C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose, foi determinado o número de UFC/mL (FRENCH, 2006; VALEFF, 2011).

4.8 PURIFICAÇÃO DA(S) BACTERIOCINA(S) PRESENTE(S) EM C75

5 A fração C75 foi selecionada para emprego na etapa de purificação por apresentar maior título de atividade antagonista (OLIVEIRA, 2010). Para isto, C75 foi submetida a etapas sequenciais de cromatografia, conforme descrito a seguir.

4.8.1 CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA - FPLC

10

A fração C75 foi submetida a cromatografia por troca iônica, em coluna Mono-QTM 5/50 GL Tricorn^{TM15} acoplado a um sistema FPLC, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 e eluída no mesmo tampão acrescido de NaCl¹⁶ 1 M, em gradiente linear de 0-100%. Foram coletadas alíquotas de 1,5 mL, com fluxo de 60 mL/h, sendo monitoradas na região de UV a 280 nm. A cromatografia foi realizada em ambiente com temperatura próxima a 25 °C. As frações obtidas foram concentradas por liofilização, diluídas em água Milli-Q[®] estéril, testadas e tituladas quanto à atividade antagonista como já descrito nos itens 4.3 e 4.4.

20

4.8.2 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR - FPLC

25 Três picos originados da cromatografia por troca iônica foram selecionados pelo seu perfil cromatográfico e titulação da atividade antagonista. As frações correspondentes a estes picos foram empregadas para a confecção de *pools*, que foram submetidos a cromatografia por exclusão molecular em coluna Superose 12 HR 10/30¹⁷ acoplada a um sistema FPLC, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em 30 fluxo de 30 mL/h e monitoradas em UV a 280 nm, liofilizadas e diluídas em água

¹⁵ GE Healthcare, Uppsala, Suécia

¹⁶ Synth, Diadema, SP, Brasil

¹⁷ GE Healthcare

Milli-Q[®] estéril. Testes de atividade e titulação foram realizados com cada uma das frações, conforme descrito nos itens 4.3 e 4.4.

5 4.8.3 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA - HPLC

Todas as frações ativas obtidas da etapa de purificação anterior foram submetidas a cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 (μ RPC, 4,6 mm x 25 cm)¹⁸ ou C18 (Poros[®], 4,6 mm x 10 cm)¹⁹, acopladas a um sistema HPLC, equilibradas com solução A (TFA²⁰ 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluídas obedecendo um gradiente de 0 a 100% de acetonitrila com solução B (acetonitrila²¹ 100% + TFA 0,05%). As frações foram eluídas com fluxo de 60 mL/h e monitoradas, empregando comprimento de onda de 280, 220 e 215 nm. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e testadas quanto a atividade antagonista (item 4.3).

Algumas frações que apresentaram atividade foram *recromatografadas* em coluna LC-18 (Supelcosil[™], 4,6 mm x 25 cm)²². Na primeira *recromatografia*, foi utilizado gradiente de 0 a 100% de acetonitrila e, na segunda, a coluna foi equilibrada com 20% de solução B, perfazendo um gradiente de 20 a 100% de acetonitrila. As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimentos de onda de 280 e 220 nm.

25 4.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem proteica do extrato C75 e das frações obtidas nas etapas de cromatografia por troca iônica e exclusão molecular foi realizada de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976). Como padrão foi utilizada solução de

¹⁸ Shimadzu

¹⁹ Life Technologies, Foster City, CA, EUA

²⁰ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

²¹ Merck, RJ, EUA

²² Sigma

soroalbumina bovina²³ 1 mg/mL. A leitura foi realizada em leitor de Elisa²⁴.

5 4.10 SDS-PAGE

O extrato C75 e algumas frações provenientes das cromatografias por troca iônica e exclusão molecular foram submetidos a SDS-PAGE a 10% (SCHAGGER & VON JAGOW, 1987). A partir dos resultados obtidos na dosagem de proteínas, procurou-se aplicar, aproximadamente, 15 µg de proteína, quando disponível. O gel foi fixado com solução de etanol²⁵ 20% e ácido acético²⁶ 10% e, em seguida, foram realizadas seis lavagens sucessivas com água Mili-Q[®] estéril, para remoção do SDS e de possíveis contaminantes microbianos. O gel foi, então, mantido em condições assépticas e encaminhado para revelação *in situ*. Assim, foi depositado em placa de Petri, sobre camada de TSA, e recoberto com 40 mL de TSA semissólido contendo 100 µL de cultura da amostra reveladora. Após incubação a 37 °C, por 24 h, em aerobiose, a leitura foi realizada pela avaliação da presença de linhas de inibição da multiplicação da amostra reveladora. A massa molecular de cada banda ativa foi estimada por comparação com padrão de massa molecular pré-corado (Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder)²⁷ (FARIAS *et al.*, 1994).

25

4.11 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A massa molecular de proteínas presentes nas frações ativas parcialmente purificadas foi avaliada utilizando-se espectrometria de massa.

²³ Sigma

²⁴ Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia

²⁵ Fmaia, Brasil

²⁶ Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²⁷ Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canada

5 Numa primeira abordagem, as amostras a serem analisadas foram solubilizadas em solução de TFA 0,1% e, em seguida, adicionadas, na proporção de 1:1, nas matrizes ácido sinapínico saturado (5 mg de solução aquosa de 3% de TFA:acetonitrila:água, 1:4:5, v/v) e DHB. Em seguida, foram transferidas (0,5 $\mu\text{L}/\text{well}$), em triplicata, para aquisição da placa de dados MALDI (MTP AnchorChips 384 x 600)²⁸ e mantidas em temperatura ambiente. As massas moleculares foram determinadas empregando-se Autoflex™ III MALDI-TOF/TOF²⁹ operando em modo linear positivo. A calibração linear foi obtida utilizando padrão de calibração proteico (Protein Calibration Standard II)³⁰.

10 Num segundo conjunto de análises, as amostras foram avaliadas utilizando-se três métodos de análise: a) LP 12 kDa (faixa de análise de m/z 2.000 a 20.000; voltagens: *Ion Source 1*: 19,9 kV; *Ion Source 2*: 18.7 kV; *Lens*: 5.0 kV), b) LP 44 kDa (faixa de análise de m/z 17.000 a 70.000; voltagens: *Ion Source 1*: 19.9 kV; *Ion Source 2*: 18.2 kV; *Lens*: 5.0 kV.) e c) LP 66 kDa (faixa de análise de
15 m/z 26.000 a 242.000; voltagens: *Ion Source 1*: 19.9 kV; *Ion Source 2*: 18.7 kV; *Lens*: 5.0 kV). Desta forma, a análise foi conduzida na faixa de, aproximadamente, 4 a 100 kDa. Adicionalmente, a análise também foi realizada empregando-se o método LP PepMix (faixa de análise de m/z 700 a 4.000; voltagens: *Ion Source 1*: 19.9 kV; *Ion Source 2*: 18.4 kV; *Lens*: 6.5 kV), apropriada
20 para o estudo de peptídeos. As amostras foram analisadas no equipamento Microflex³¹. A calibração proteica foi feita pelos métodos LP 12 kDa e LP PepMix, empregando-se *Protein Standard Calibrant I* e *Peptide Standard Calibration II*³², respectivamente.

²⁸ Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

²⁹ Bruker Daltonics

³⁰ Bruker Daltonics

³¹ Bruker Daltonics

³² Bruker Daltonics

4.12 REDUÇÃO, ALQUILAÇÃO E TRIPSINÓLISE DA BACTERIOCINA PARCIALMENTE PURIFICADA

5 Algumas frações ativas provenientes da cromatografia de fase reversa foram submetidas a sequenciamento. Assim, a concentração proteica foi estimada por espectrofotometria (leitura a 280 nm). Após concentração das amostras em concentrador a vácuo³³, elas foram dissolvidas em 18 µL de solução de bicarbonato de amônio³⁴ 200 mM, ureia³⁵ 6 M e tiourea³⁶ 2 M. Então, foram
10 adicionados 5 µL de solução de DTT³⁷ 50 mM e bicarbonato de amônio 100 mM. A mistura foi incubada por 3 h a 25 °C. Em seguida, 5 µL solução iodoacetamida³⁸ 100 mM e bicarbonato de amônio 100 mM foram adicionados e o material foi incubado por 30 min, a 25 °C, protegido da luz. Após este período, a mistura foi dissolvida 6x em água Mili-Q® e o valor de pH, entre 7,5 e 8,0 foi conferido com
15 auxílio de tiras indicadoras de pH³⁹. Tripsina⁴⁰ foi, então, adicionada na proporção de 1 mg/100 mg de proteína. Em seguida, a mistura foi incubada a 37 °C por 16 h. A tripsinólise foi interrompida pela adição de ácido fórmico. Os fragmentos proteicos obtidos foram separados por meio de cromatografia de fase reversa em coluna LC-18.

20

4.13 SEQUENCIAMENTO

25

A sequência de aminoácidos dos fragmentos proteicos obtidos após tripsinólise foi determinada por meio de experimentos de MS/MS, operado em MALDI-TOF e conduzida segundo metodologia LIFT™ (SUCKAU *et al.*, 2003),

³³ Univapo 100 H, UniEquip, Munich, Alemanha

³⁴ Synth, Diadema, SP, Brasil

³⁵ USB, Cleveland, OH, EUA

³⁶ Merck Milipore, Darmstadt, Alemanha

³⁷ Sigma

³⁸ Sigma

³⁹ Merck

⁴⁰ Promega, Madison, WI, EUA

com os seguintes parâmetros de voltagem do instrumento: *Ion source 1*: 6.00 kV, *Ion source 2*: 5.25 kV, *Lens*: 3.00 kV, *Reflector 1*: 27.00 kV, *Reflector 2*: 11.80 kV, LIFT 1, 19.00 kV, LIFT 2: 4.70 kV. As sequências de aminoácidos dos peptídeos foram determinadas manualmente, com auxílio do *software* Flex Analysis⁴¹ para atribuir as séries y e b sempre que possível. Algumas fragmentações preferenciais da cadeia peptídeo foram consideradas (PAIZS & SUHAAI, 2005).

As sequências de aminoácidos dos peptídeos que puderam ser detectados foram comparadas a sequências de proteínas já descritas, empregando-se o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A busca foi realizada priorizando-se o gênero *Shigella*. As sequências de peptídeos detectadas também foram comparadas com as bacteriocinas depositadas no BACTIBASE (*Database dedicated to bacteriocins*, <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>).

⁴¹ Bruker Daltonics

5 RESULTADOS

5 5.1 TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75

As frações C30, C75 e S75 apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora SsR (FIG. 3).

10

5.2 TITULAÇÃO DA FRAÇÃO C75

15

O título da fração C75 foi de 819.200 UA/mL (FIG. 4).

20 5.3 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DA AMOSTRA PRODUTORA E DAS FRAÇÕES C30, C75 E S75

A amostra de *S. sonnei* produtora e os extratos proteicos ativos foram
25 testados contra um total de 549 amostras bacterianas e três amostras de leveduras. Atividade antagonista foi detectada contra 12,2 % (67) amostras bacterianas, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *Enterobacter* spp. e *E. coli* (TAB. 1 e GRAF. 1). Foram observados halos de inibição da amostra reveladora de diversos tamanhos, diferenciados apenas por inspeção visual, em pequeno (halo restrito à
30 borda da amostra produtora), médio (diâmetro de cerca de 2 cm) e grande (diâmetro de cerca de 3 cm) (TAB. 1 e FIG. 5).

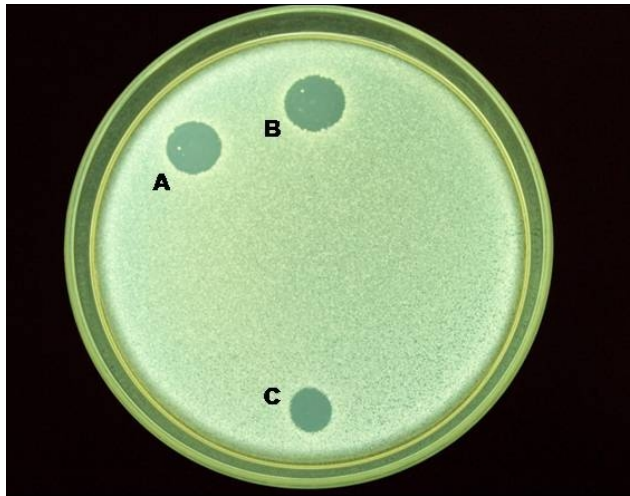


Figura 3. Avaliação da atividade dos extratos proteicos intracelulares C30 (A) e C75 (B) e extracelular S75 (C), precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 30% e 75%, contra *Shigella sonnei* SsR.

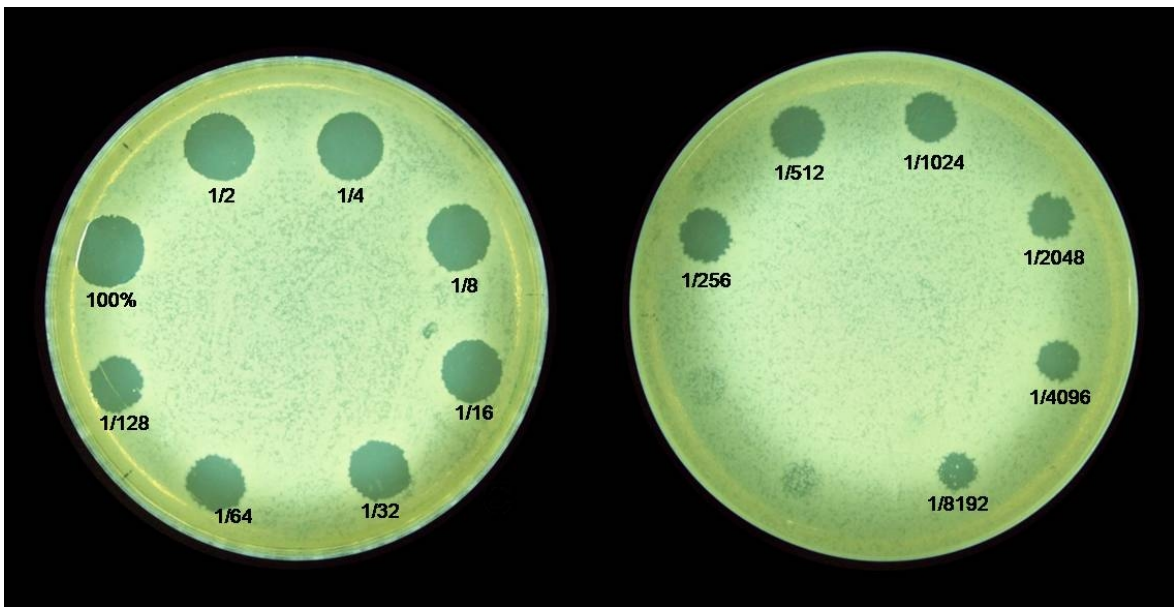


Figura 4. Titulação da atividade antagonista da fração C75 (extrato proteico intracelular precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75%, contra *Shigella sonnei* SsR. Título = 819.200 UA/mL.

Tabela 1. Espectro de atividade antagonista de *Shigella sonnei* (SsP).

Amostra reveladora ^a	Amostra produtora			Total	Extrato proteico		
	Tamanho do halo de inibição				Intracelulares		Extracelular
	Grande ^b	Médio ^c	Pequeno ^d		C30 ^e	C75 ^f	S75 ^f
<i>Escherichia coli</i> n = 112	11(40,7%)	12 (44,4%)	4 (14,8%)	27 (24,1%)	15 (13,4%)	14 (12,5%)	3 (2,7%)
<i>Shigella flexneri</i> n = 20	0	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (55,0%)	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i> n = 34	14 (53,8%)	11 (42,3%)	1 (3,8%)	26 (76,5%)	14 (41,2%)	26 (76,5%)	14 (41,2%)
<i>Enterobacter spp.</i> n = 51	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0	3 (5,9%)	0	0	0

^a, outras amostras reveladoras testadas (não sensíveis): *Providencia*. (11), *Proteus mirabilis* (53), *Citrobacter freundii* (52), *Citrobacter koseri* (38), *Klebsiella pneumoniae* (54), *Morganella morganii* (61), *Salmonella enterica* (7), *Bifidobacterium* (10), *Bacteroides* (12), *Lactobacillus* (6), *Fusobacterium* (4), *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10557, *Streptococcus uberis* ATCC 9927, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* FDC Y4, *Eikenella corrodens* ATCC 23834, *Eubacterium lentum* ATCC 25559, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Porphyromonas gingivalis* FDC 381, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella. nigrescens* ATCC 33569, *Prevotella melaninogenica* ATCC 24845, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25286, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Actinomyces israelii* ATCC 12102; ^b, ø halo ≈ 3 cm; ^c, ø halo ≈ 2 cm; ^d, halo restrito à borda da amostra produtora; ^e, precipitado com 30% de (Na₄)₂SO₄; ^f, precipitado com 75% de (Na₄)₂SO₄.

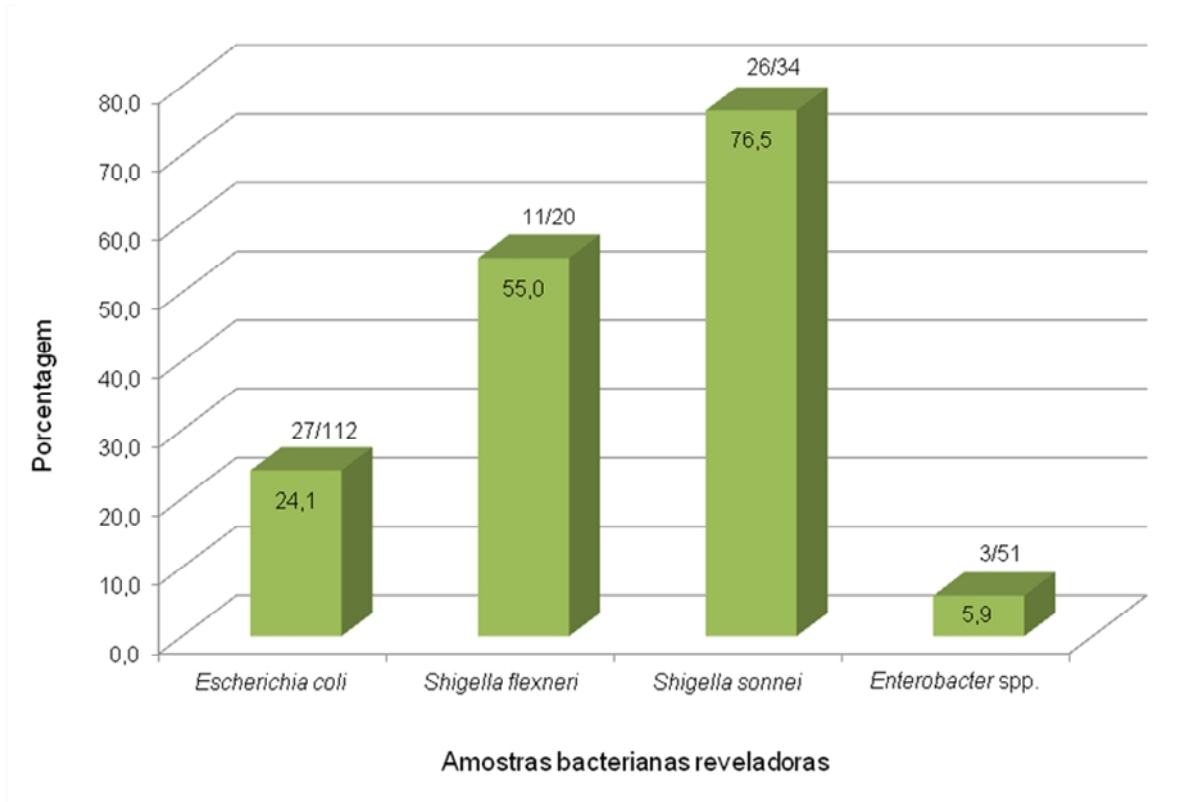


Gráfico 1. Frequência de amostras de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* e *Enterobacter* spp. sensíveis à ação antagonista expressa por *S. sonnei* SsP.

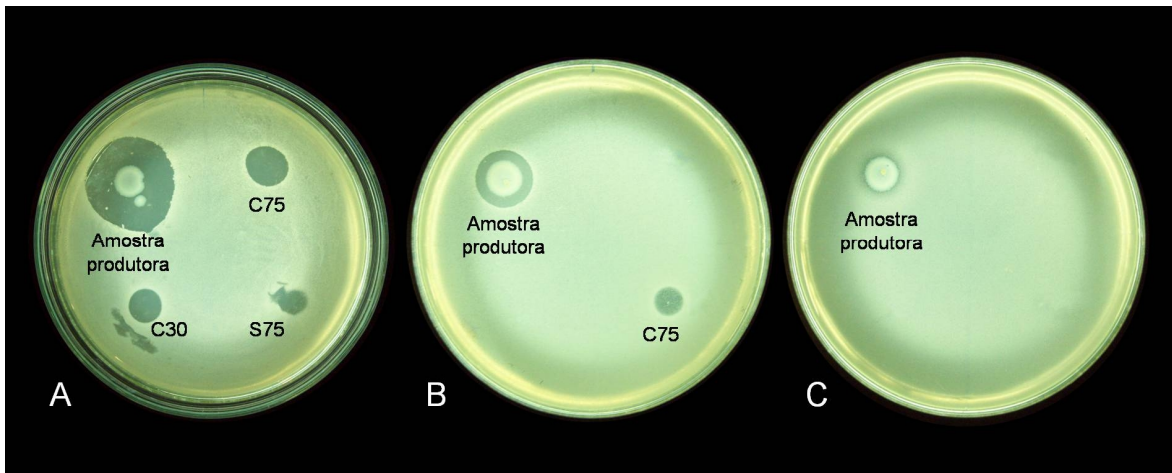


Figura 5. Avaliação do espectro de ação de *Shigella sonnei* e dos extratos proteicos intracelulares C30 (A) e C75 (B) e extracelular S75 (C), precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 30% e 75%. A. Halo grande, aproximadamente 3 cm de diâmetro; B. Halo médio, aproximadamente 2 cm de diâmetro; e C. Halo pequeno, restrito à borda da amostra produtora.

De forma geral, as amostras sensíveis ao extrato C75 também foram sensíveis à amostra produtora. Por outro lado, nem todas as amostras sensíveis à amostra produtora também foram inibidas por seus extratos proteicos. Merece destaque uma amostra de *S. sonnei* que, inversamente, foi sensível aos três extratos proteicos, mas não foi inibida pela amostra produtora (FIG. 6). Entre as frações proteicas, C75 expressou atividade mais frequentemente que C30 e S75.

5

Uma amostra de *Bifidobacterium* e cinco amostras de *Bacteroides* também demonstraram sensibilidade à atividade antagonista expressa por *S. sonnei*. Entretanto, este resultado não foi reprodutível.

10

5.4 AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE POPULACIONAL DA AMOSTRA PRODUTORA EM RELAÇÃO À CARACTERÍSTICA EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO

15

Todos os clones da amostra produtora testados expressaram antagonismo. Foram observadas diferenças no diâmetro dos halos de inibição de acordo com a amostra reveladora empregada (FIG. 7).

20

5.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE C75

25

5.5.1 CIM

A menor concentração do extrato C75 capaz de inibir a multiplicação visível da amostra reveladora *S. sonnei* SsR foi de 200 UA/mL.

30

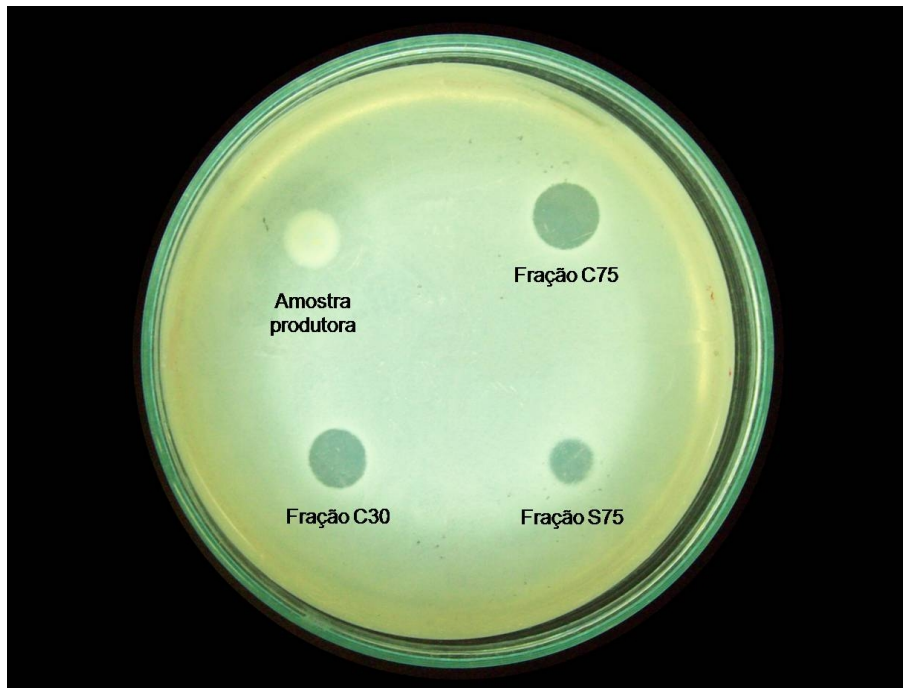


Figura 6. Atividade antagonista dos extratos proteicos intracelulares C30 (A) e C75 (B) e extracelular S75 (C), precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 30% e 75% contra uma amostra de *S. sonnei*. A amostra de *S. sonnei* produtora não apresentou atividade significativa.

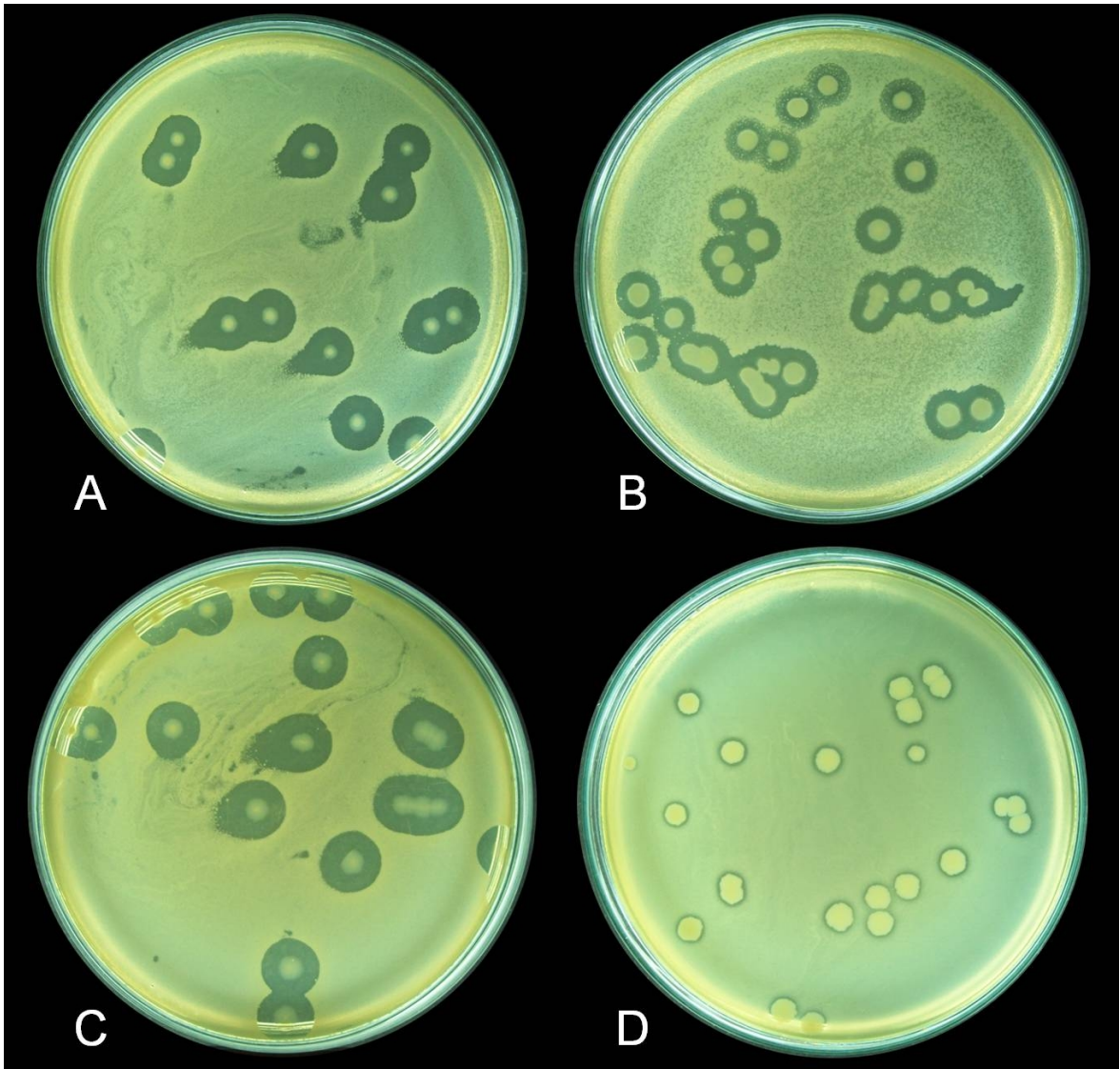


Figura 7. Distribuição da característica *expressão de antagonismo* na população de *Shigella sonnei* SsP. Observa-se atividade para todos os clones e variação no tamanho dos halos para as diferentes amostras reveladoras utilizadas. A. *S. sonnei* SsR, B. *S. sonnei* Ss1, C. *Escherichia coli* K 12 Row e D. *Shigella flexneri* ATCC 12022.

5.5.2 CBM

A fração C75 apresentou CBM igual a 200 UA/mL. Foram observadas, em média, $6,9 \times 10^3$ UFC da bactéria reveladora/mL, o que representa redução superior a 99,9% em relação à contagem bacteriana do controle positivo (média de $3,7 \times 10^8$ UFC/mL). Nos testes com concentração igual ou superior a 400 UA/mL, não foram detectadas células viáveis.

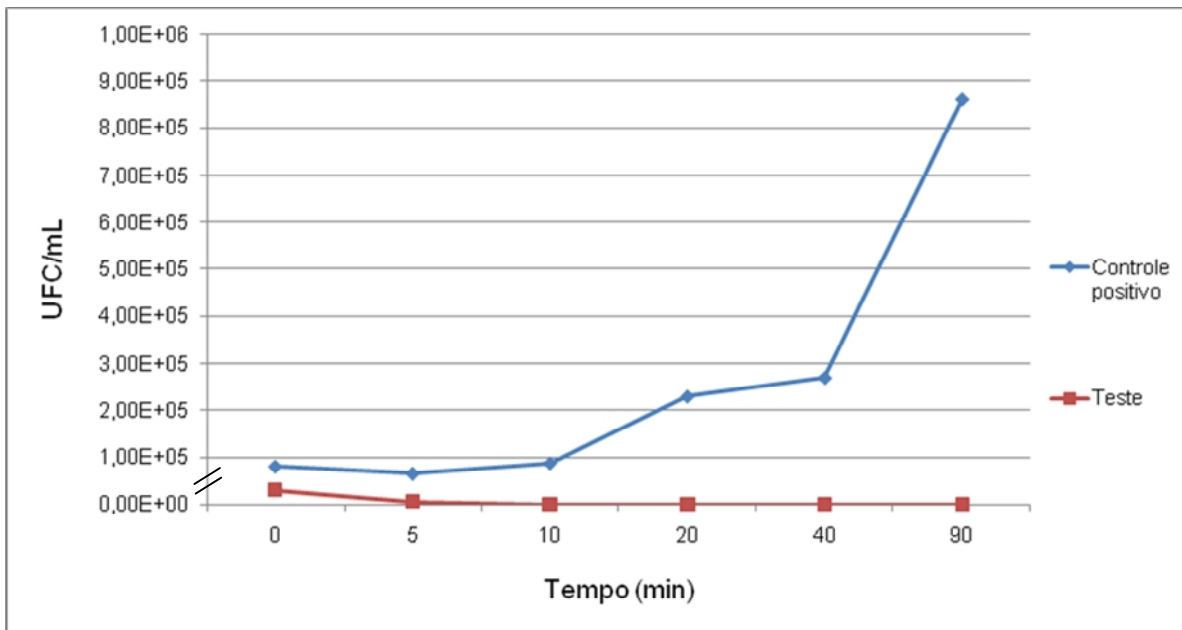
10 5.5.3 CINÉTICA DE AÇÃO

A cinética da ação antibacteriana da fração C75 foi acompanhada durante um intervalo de tempo de 0 a 90 min (TAB. 2 e GRAF. 2 e 3). Já no tempo zero, a contagem de UFC era quase três vezes menor que no controle positivo. Em 10 min, o número de células viáveis diminuiu 99,7% e, em 20 min, nenhuma célula viável foi detectada.

20 Tabela 2. Cinética da ação do extrato C75 contra *Shigella sonnei*.

Tempo (min)	Número médio de UFC/mL	
	Controle positivo	Teste
0	$8,07 \times 10^4$	$2,97 \times 10^4$
5	$6,55 \times 10^4$	$5,43 \times 10^3$
10	$8,76 \times 10^4$	$1,00 \times 10^2$
20	$2,30 \times 10^5$	0
40	$2,70 \times 10^5$	0
90	$8,60 \times 10^5$	0

5

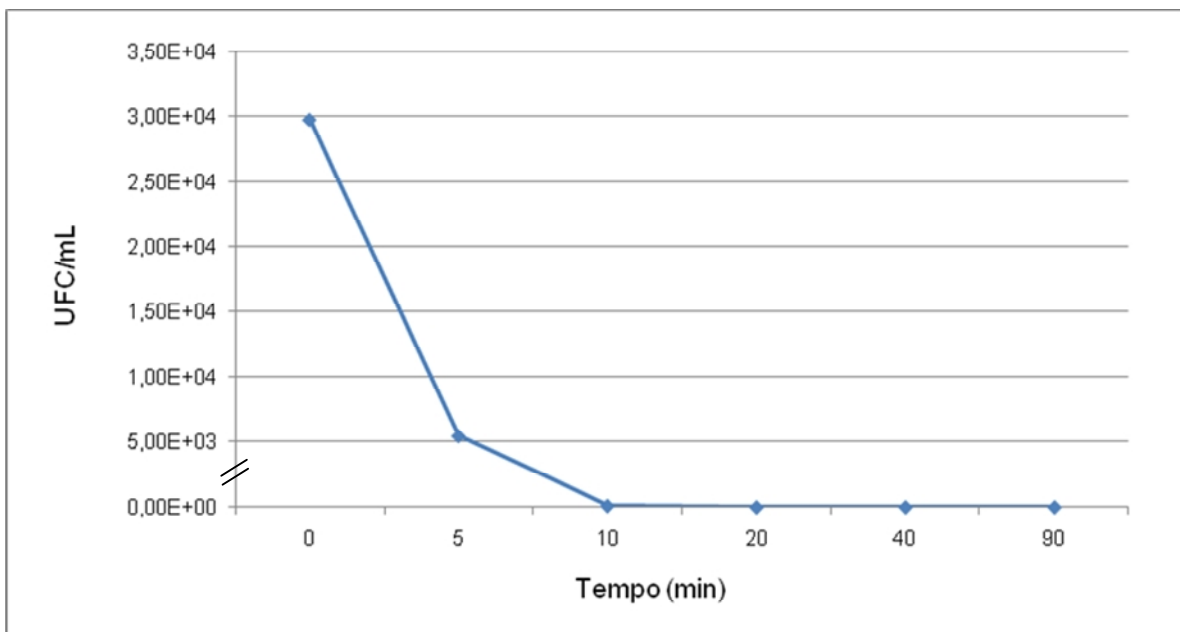


10

Gráfico 2. Curva de crescimento da amostra de *Shigella sonnei* SsR na ausência e na presença do extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% (C75; 200 UA/mL).

15

5



10

Gráfico 3. Curva de inibição da amostra de *Shigella sonnei* SsR na presença do extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% (C75; 200 UA/mL).

5.6 PURIFICAÇÃO DA(S) BACTERIOCINA(S) PRESENTE(S) EM C75

Para facilitar a compreensão dos resultados relativos a esta etapa do estudo, foram elaborados dois fluxogramas, que apresentam, de maneira esquemática, as frações ativas provenientes de cada procedimento de purificação proteica realizado (FIG. 8 e 9).

5.6.1 CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA - FPLC

A FIG. 10 apresenta o perfil da cromatografia por troca iônica à qual o extrato C75 foi submetido. Todas as frações obtidas no ensaio apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora. Três picos foram selecionados com base no perfil cromatográfico e no título de atividade antagonista, sendo encaminhados para a cromatografia por exclusão molecular: o pico A, correspondente às frações 1 a 5, que não se ligaram à coluna; o pico B, correspondente às frações 13 e 14, e o pico C, formado pelas frações 15 e 16 (TAB. 3).

20

5.6.2 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR - FPLC

As FIG. 11 a 13 apresentam os perfis das cromatografias por exclusão molecular dos picos A, B e C, provenientes da cromatografia por troca iônica. A TAB. 3 apresenta os picos ativos e suas respectivas frações.

30

5.6.3 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA - HPLC

Várias frações apresentaram atividade, sendo que algumas foram *recromatografadas*. Embora o pico A.5 (fração 10 da cromatografia de exclusão molecular proveniente das frações 1 a 5 da cromatografia de troca-iônica) apresente a melhor relação atividade antagonista/concentração de proteínas

(TAB. 3; FIG. 11), as cromatografias dos picos C.2 e C.4 (frações 3 a 5 e fração 10, respectivamente, originados da cromatografia por exclusão molecular, TAB. 3) foram as que apresentaram, até o momento, os resultados mais promissores devido a dificuldades técnicas apresentadas na purificação dos demais picos.

5 A FIG. 14 ilustra a cromatografia de fase reversa do pico C.2. Todas as frações foram testadas quanto à presença de atividade antagonista (item 4.3) e as frações B4 a C10 foram positivas, apresentando halo límpido de inibição da amostra reveladora. Os *pools* 1 e 2 (frações B4 a B9 e frações B10 a B15, respectivamente), encaminhados para *recromatografia* de fase reversa, 10 originaram os perfis cromatográficos gerados representados nas FIG. 15 e 16.

A *recromatografia* do *pool* 1 (FIG. 15) gerou três frações ativas, 35, 36 e 37. O resultado da *recromatografia* das frações 35 (FIG. 17), 36 e 37 (FIG. 18) demonstra atividade antagonista contra a amostra reveladora em cinco (35 a 41), seis (36 a 41) e quatro (37 a 40) frações, respectivamente.

15 A cromatografia de fase reversa do *pool* 2 (FIG. 16) gerou sete frações ativas, 33 a 39. As *recromatografias* dos *pools* das frações 33 e 34, *pool* 3, 35 e 36, *pool* 4, originaram, respectivamente, seis e sete frações ativas, 34 a 39 (FIG. 19) e 36 a 42.

20 A FIG. 20 ilustra o resultado da cromatografia de fase reversa do pico C.4 (TAB. 3). As frações C1 a C10 apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora. A *recromatografia* da fração C4 não gerou nenhuma fração ativa.

25 Não foram realizados dosagem de proteínas nem SDS-PAGE de nenhuma fração proveniente das cromatografias de fase reversa devido à pequena quantidade de material obtido.

5.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

30

C75 apresentou concentração proteica de 37 mg/mL. Considerando o título de atividade antagonista em UA/mL determinado para este extrato (item

5.2), o título de atividade antagonista calculado em UA/mg de proteína é de 22.140,54. Cada extração permitiu a recuperação de 8 mL de C75, ou seja, 296 mg de proteínas. A TAB. 3 apresenta a dosagem proteica das frações obtidas pelas cromatografias de troca iônica e exclusão molecular.

5

5.8 SDS-PAGE

10

SDS-PAGE de C75 demonstrou a presença de duas linhas de inibição da amostra reveladora com massas moleculares de, aproximadamente, 57 e 66 kDa (FIG. 21).

15 A FIG. 22 apresenta o resultado de SDS-PAGE dos picos A, B e C (TAB. 3) obtidos na cromatografia por troca iônica. Observa-se a presença de faixas de inibição da amostra reveladora na mesma faixa de massa molecular do extrato C75. Destaca-se o pico C, que apresenta apenas a banda de cerca de 66 kDa.

20 A FIG. 23 apresenta o resultado de SDS-PAGE dos picos ativos provenientes da cromatografia por exclusão molecular do pico C originado da cromatografia por troca iônica. Somente o pico C.4 (fração 10) gerou banda ativa, cuja massa molecular também é de, aproximadamente, 66 kDa.

25

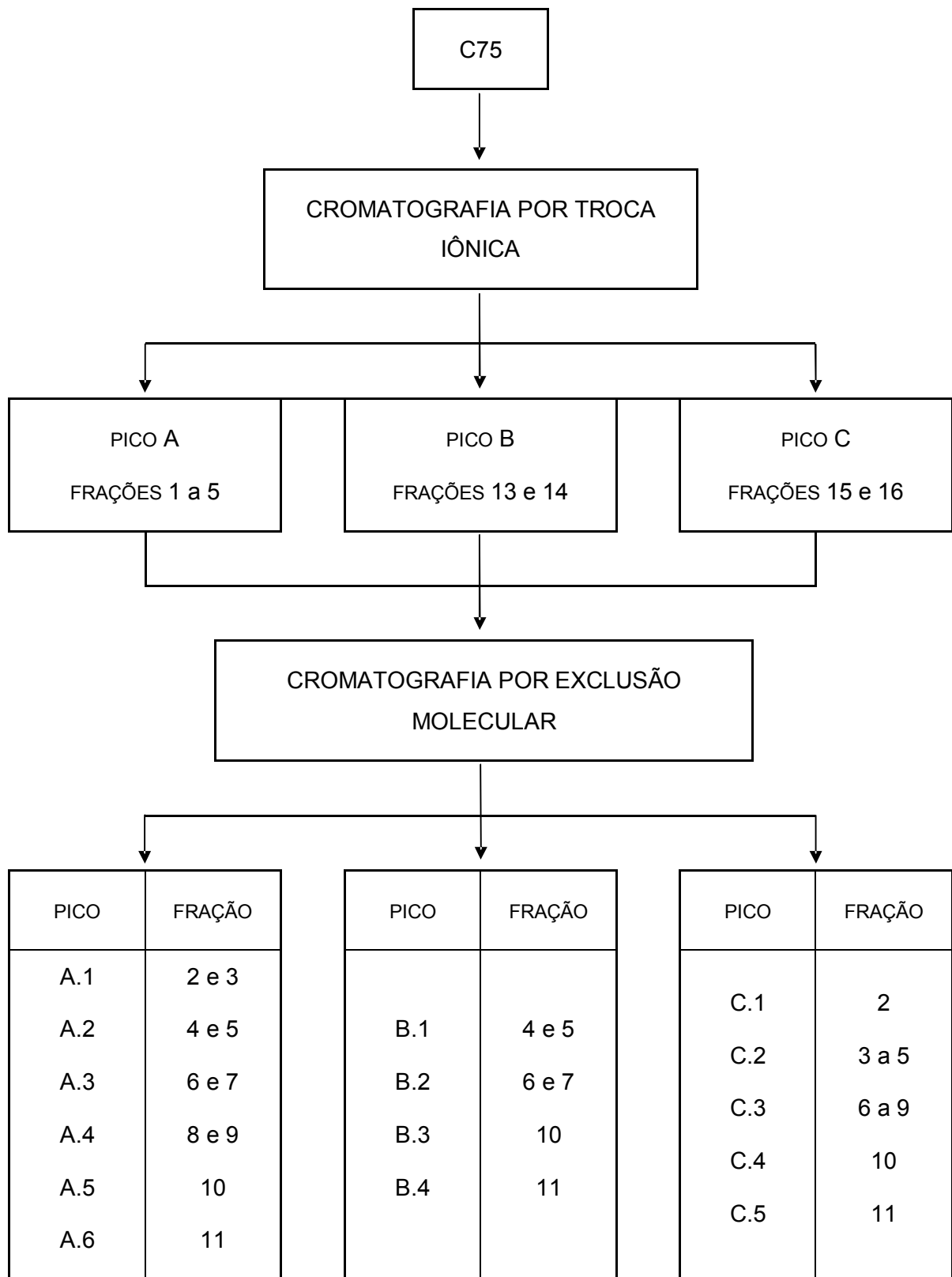


Figura 8. Fluxograma do processo de purificação da(s) substância(s) antagonista(s): cromatografia por troca iônica e exclusão molecular.

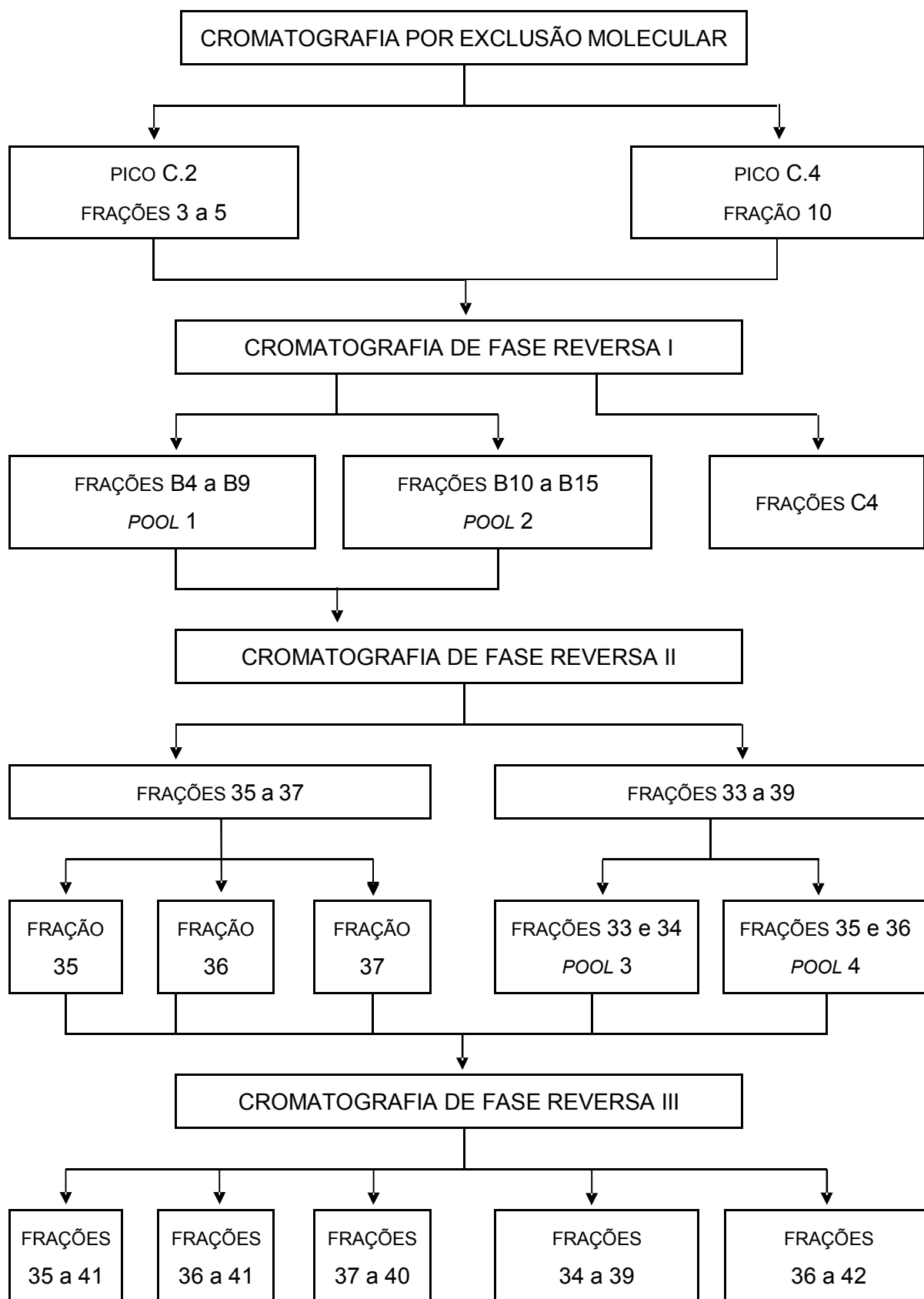


Figura 9. Fluxograma do processo de purificação da(s) substância(s) antagonista(s): cromatografia de fase reversa.

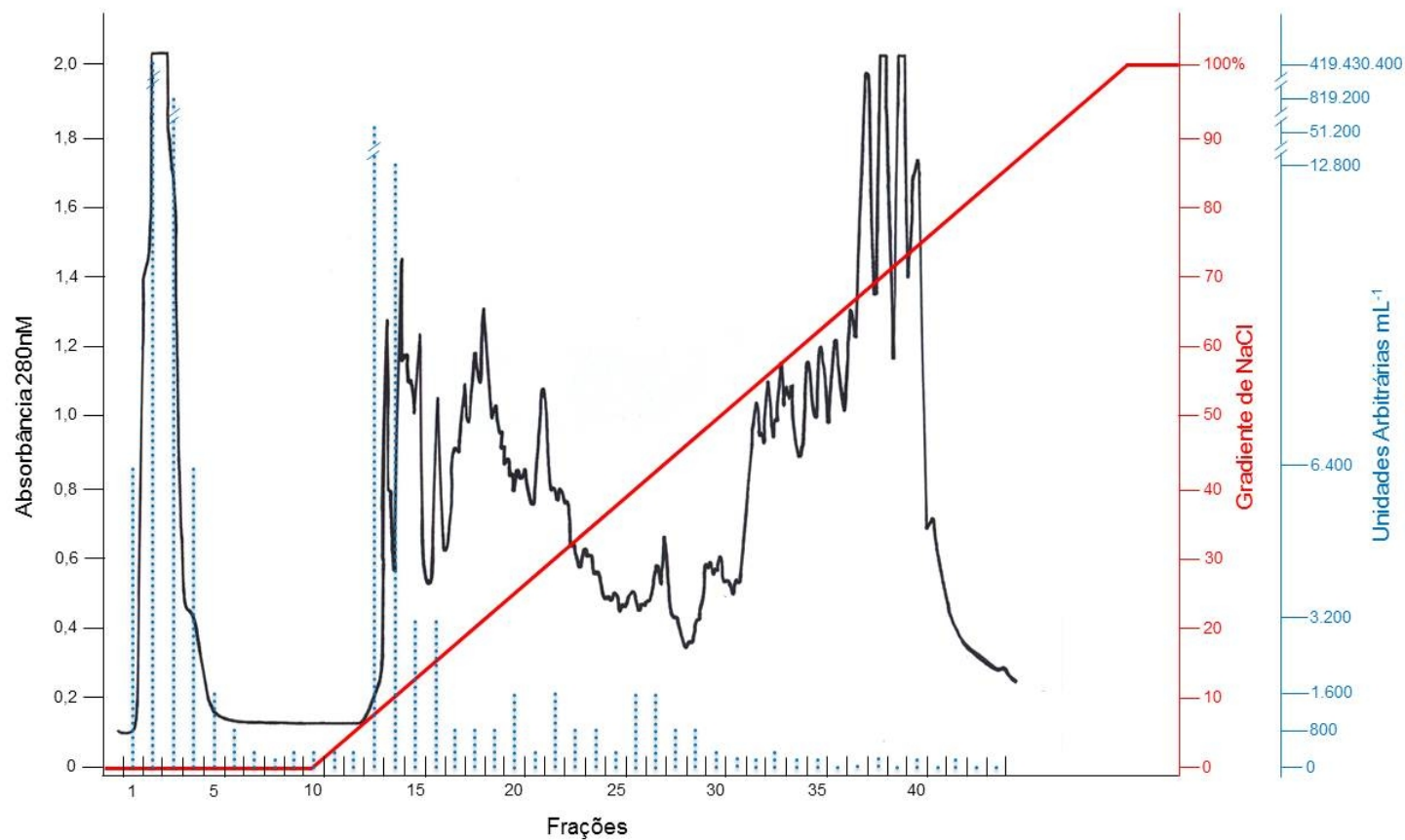


Figura 10, Cromatografia por troca iônica de C75 (extrato proteico intracelular precipitado em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75%), em coluna Mono-QTM 5/50 GL TricornTM, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 e eluída no mesmo tampão acrescido de NaCl 1 M, em gradiente linear de 0-100% (vermelho), Leitura de absorbância em 280 nm (preto), Titulação da atividade antagonista de cada uma das frações em azul, Os picos A (frações 1 a 5), B (frações 13 e 14) e C (frações 15 e 16), ativos, foram encaminhados para cromatografia por exclusão molecular.

Tabela 3. Concentrações proteicas das frações provenientes das cromatografias por troca iônica e exclusão molecular.

C75 ^a		Cromatografia							
		Troca iônica				Exclusão molecular			
Concentração (µg/µL)	Total (µg)	Picos	Frações	Concentração (µg/µL)	Total (µg)	Picos	Frações	Concentração (µg/µL)	Total (µg)
37	74000	A	1 a 5	1,22	610	A.1	2 e 3	0,29	145
						A.2	4 e 5	0,25	125
						A.3	6 e 7	0,07	35
						A.4	8 e 9	0,34	170
						A.5	10	0,17	85
		B	13 e 14	1,29	645	A.6	11	0,47	235
						B.1	4 e 5	0,54	270
						B.2	6 e 7	0,07	35
						B.3	10	0,00	0
		C	15 e 16	5,06	2530	B.4	11	0,05	25
						C.1	2	0,03	15
						C.2	3 a 5	4,32	2160
						C.3	6 a 9	0,03	15
						C.4	10	0,13	65
								C.5	11

^a, extrato intracelular obtido por precipitação com 75% de (Na₄)₂SO₄, 2 mL.

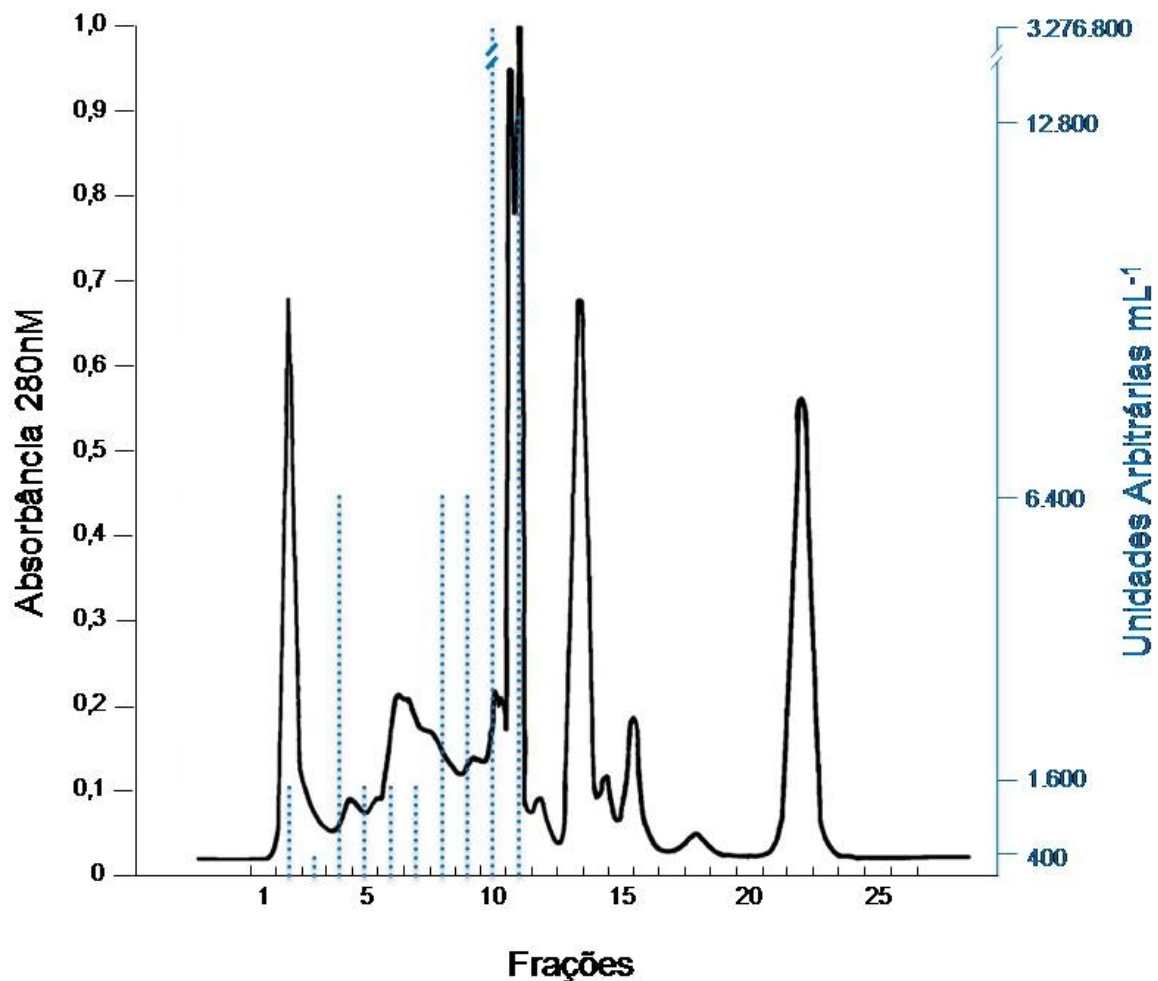


Figura 11. Cromatografia por exclusão molecular do pico A (frações 1 a 5) proveniente da cromatografia por troca iônica. Coluna Superose 12 HR 10/30 (GE Healthcare), fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h. Monitoramento com leituras a 280 nm (preto). A titulação da atividade antagonista de cada uma das frações está representada em azul. Os picos A.1 a A.6, frações 2 a 11 apresentaram atividade.

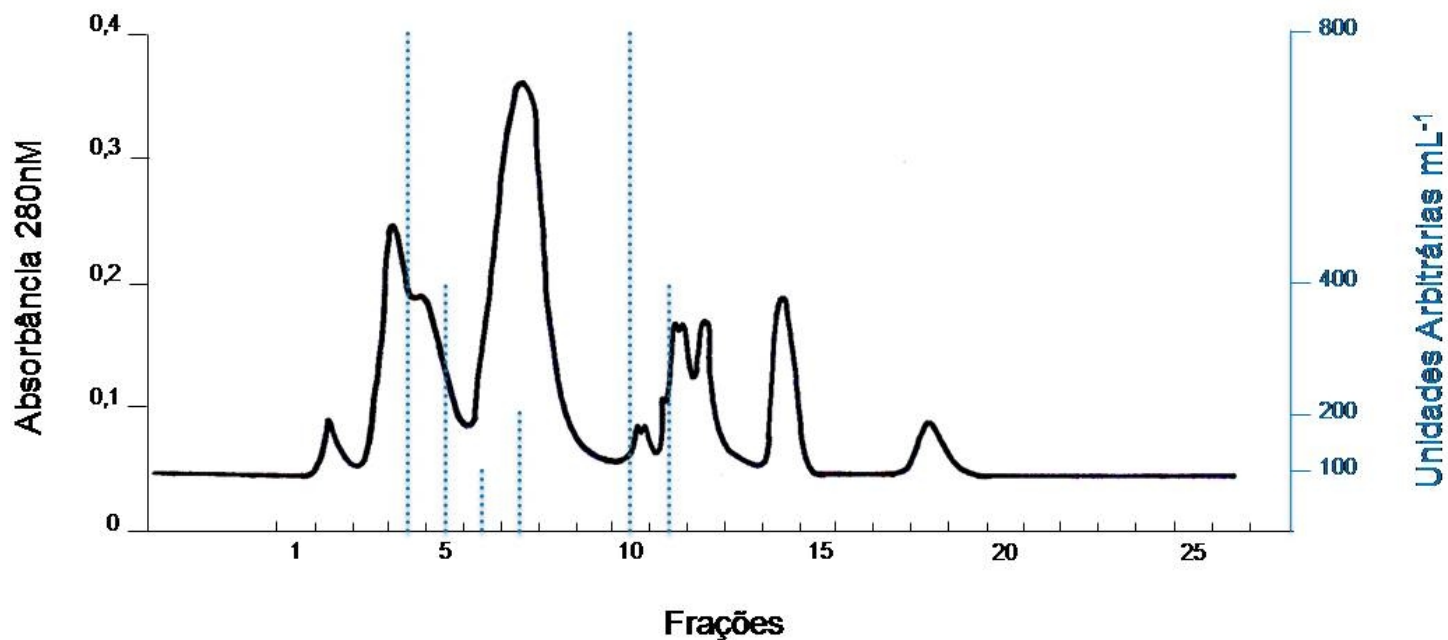


Figura 12, Cromatografia por exclusão molecular do pico B (frações 13 e 14) proveniente da cromatografia por troca iônica, Coluna de Superose 12 HR 10/30, fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0, Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h, Leitura a 280 nm (preto), Titulação da atividade antagonista de cada uma das frações em azul, Os picos B,1 a B,4, frações 4 a 7, 10 e 11 apresentaram atividade,

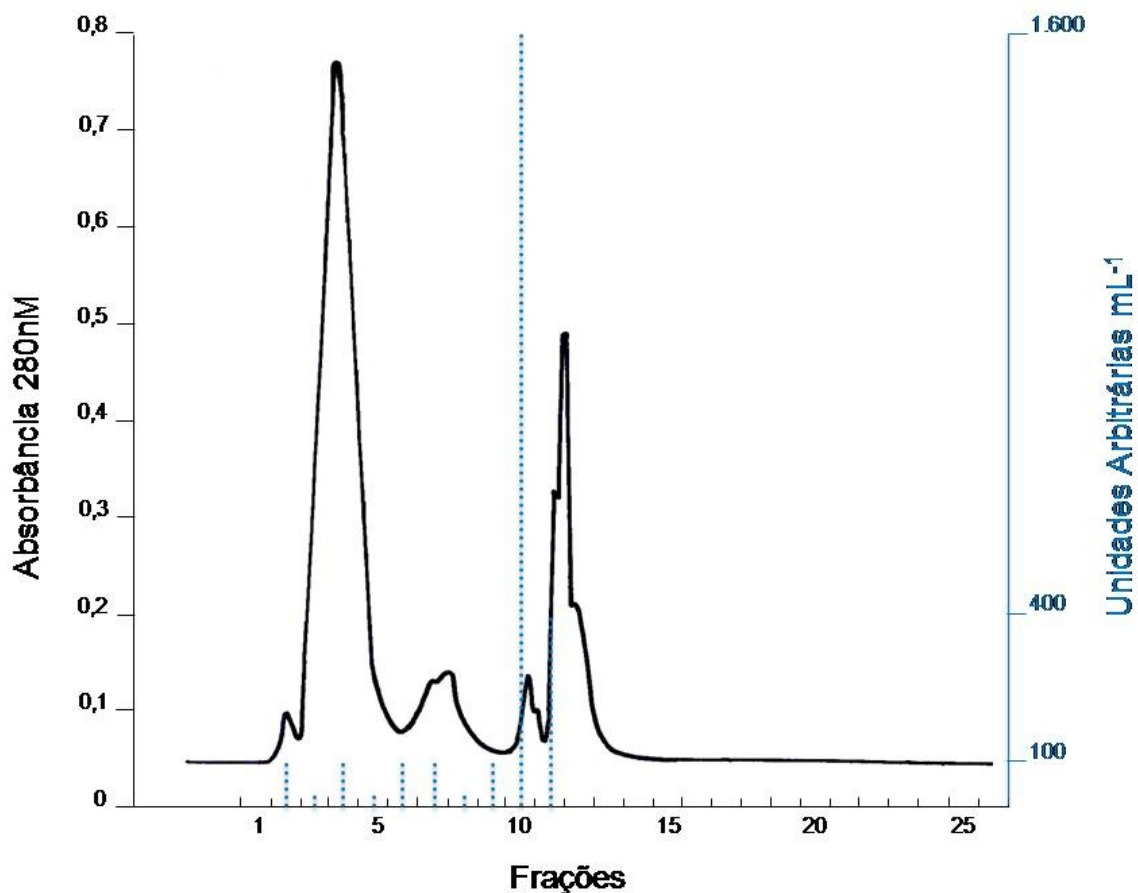
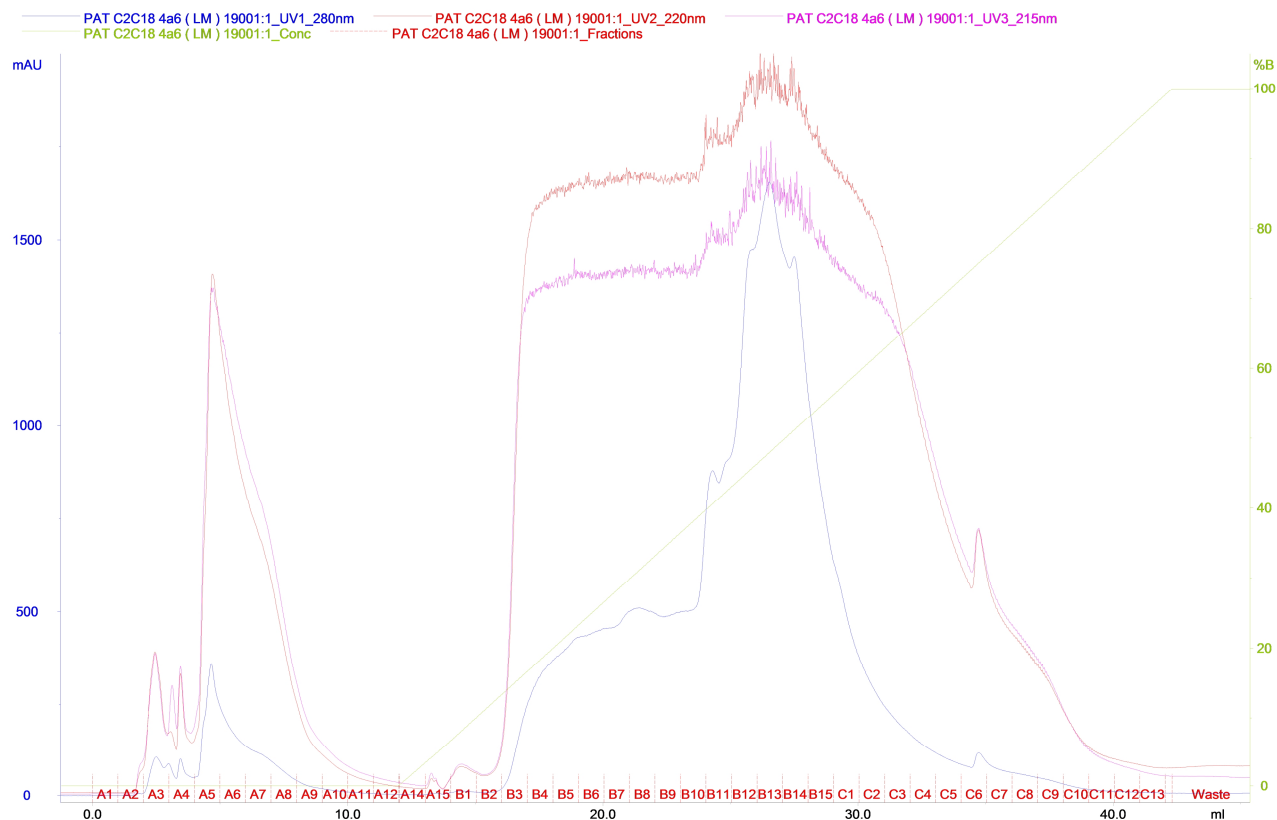


Figura 13. Cromatografia por exclusão molecular do pico C (frações 15 e 16) proveniente da cromatografia por troca iônica. Coluna Superose 12 HR 10/30 (GE Healthcare), fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h. Monitoramento com leituras a 280 nm (preto). A titulação da atividade antagonista de cada uma das frações está representada em azul. Os picos C.1 a C.5, frações 2 a 11 apresentaram atividade. Os picos C.2 (frações 3 a 5) e C.4 (fração 10) foram encaminhados para cromatografia por fase reversa.



5 Figura 14, Cromatografia de fase reversa em coluna μ RPC C2/C18 do pico C,2 (frações 3 a 5) proveniente da cromatografia por filtração molecular, Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (azul), 220 nm (vermelho) e 215 nm (rosa), Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde), As frações B4 a C10 apresentaram atividade antagonista e as frações B4 a B9 e B10 a B15 foram encaminhadas para *recromatografia* (fase reversa),

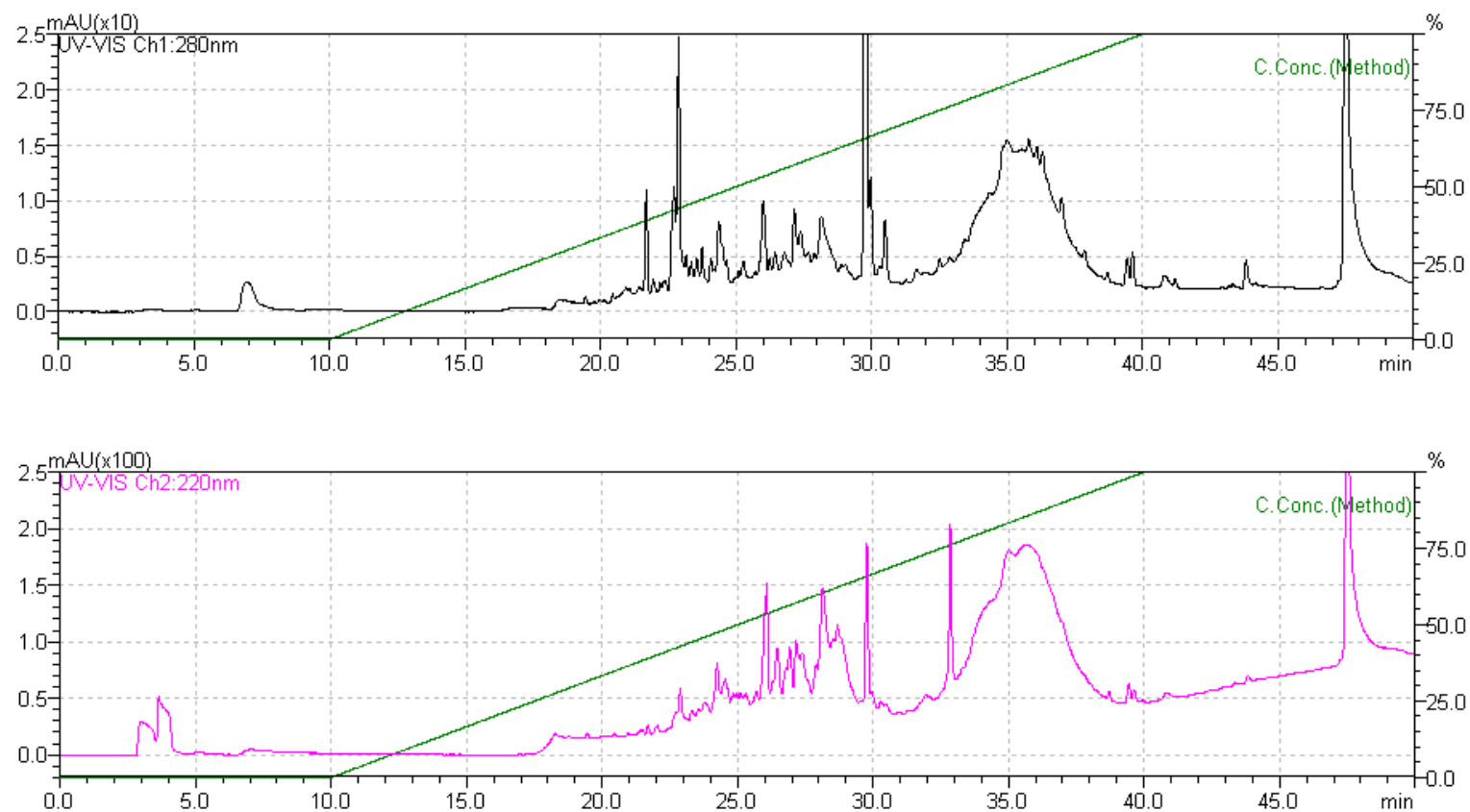
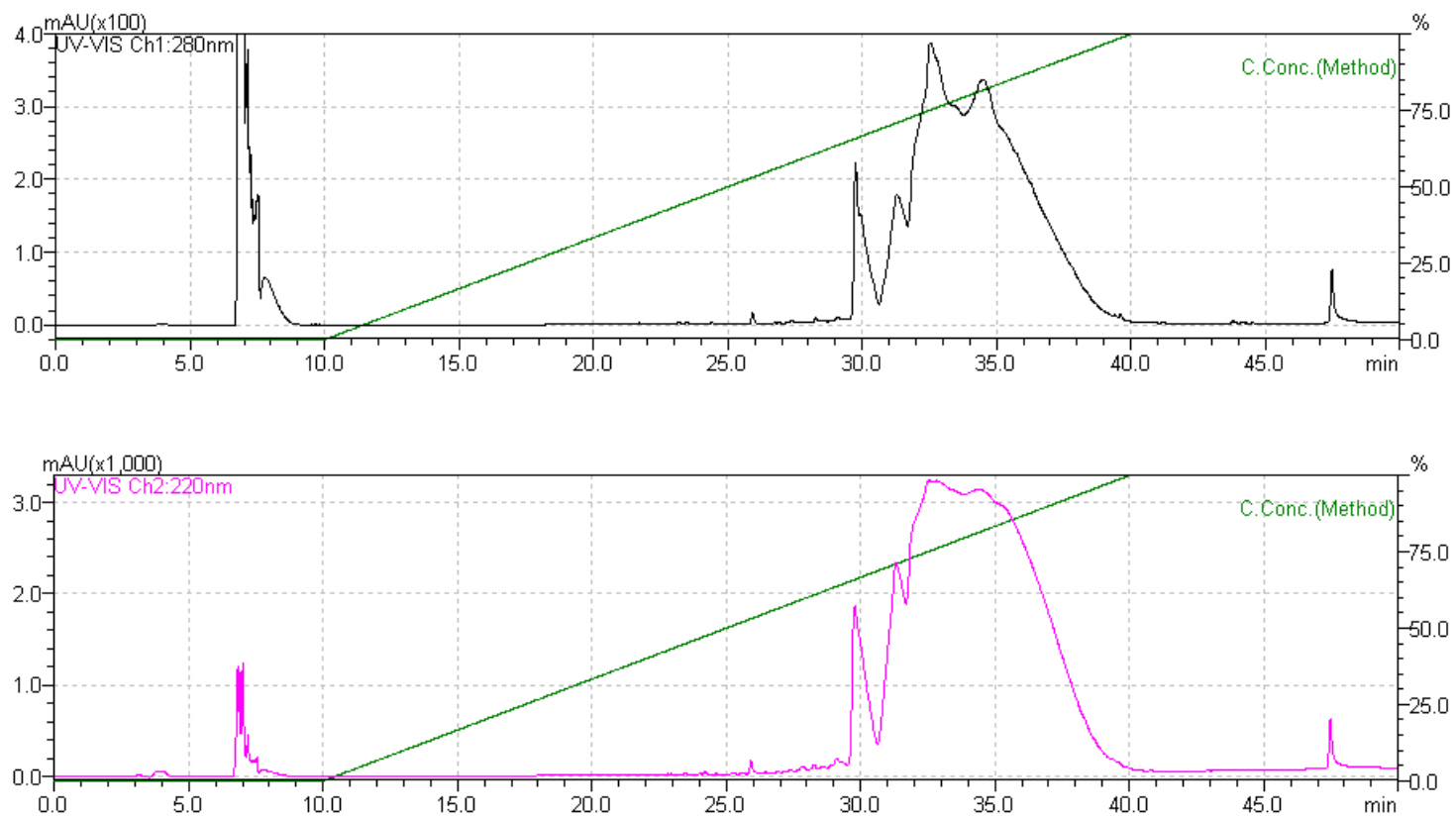


Figura 15, Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 das frações B4 a B9 (*pool* 1) provenientes de cromatografia de fase reversa, Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q®) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa), Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde), As frações 35 a 37 apresentaram atividade antagonista e foram encaminhadas para *recromatografia* (fase reversa),

5



5 Figura 16, Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 das frações B10 a B15 (*pool 2*) provenientes de cromatografia de fase reversa, Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa), Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde), As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 33+34 e 35+36 foram *recromatografia* (fase reversa),

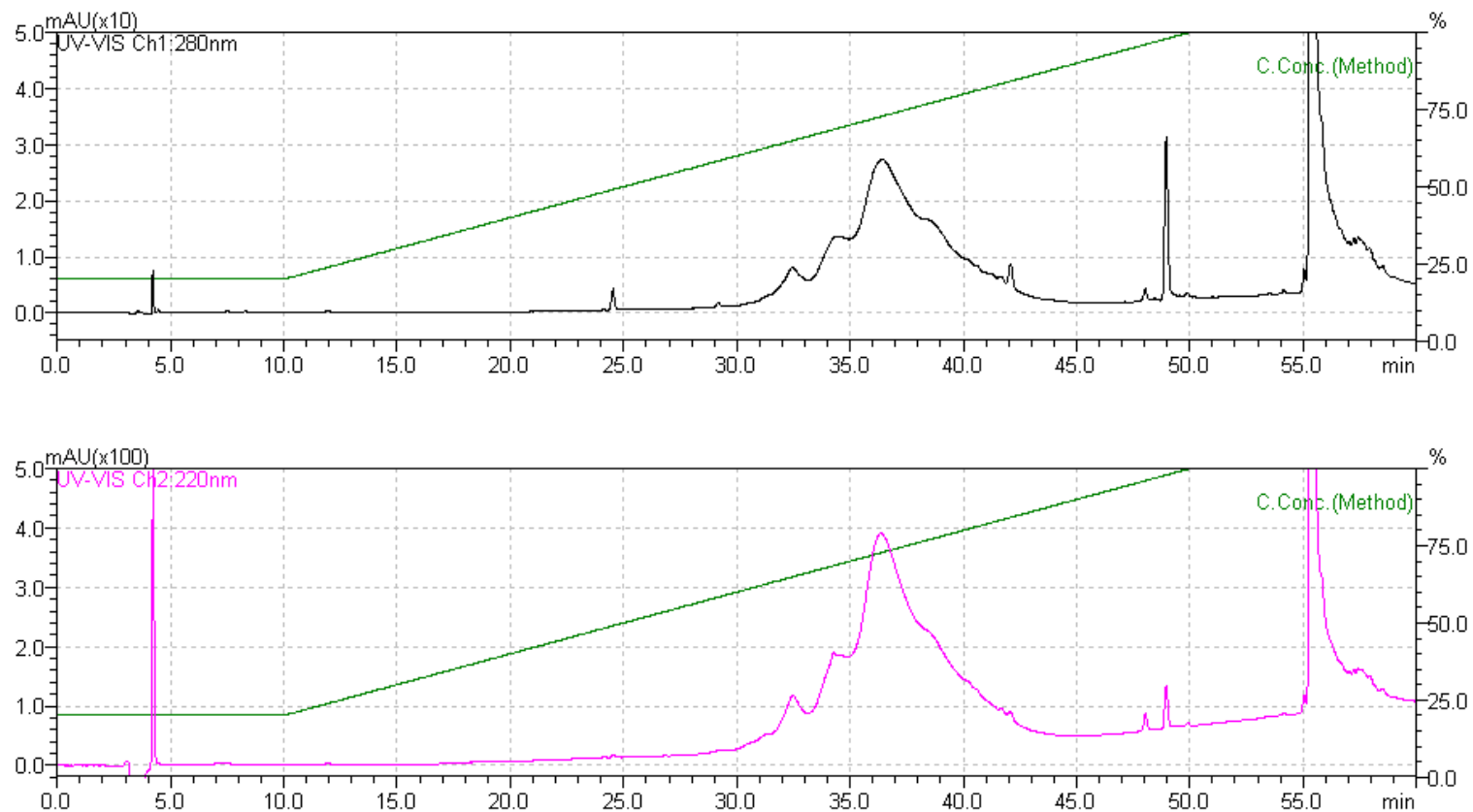


Figura 17, Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 da fração 35 proveniente de cromatografia de fase reversa, Coluna equilibrada com 20% de solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), perfazendo gradiente de 20 a 100% de acetonitrila (verde), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa), As frações 35 a 41 apresentaram atividade antagonista e as frações 35 a 39 foram encaminhadas para espectrometria de massa,

5

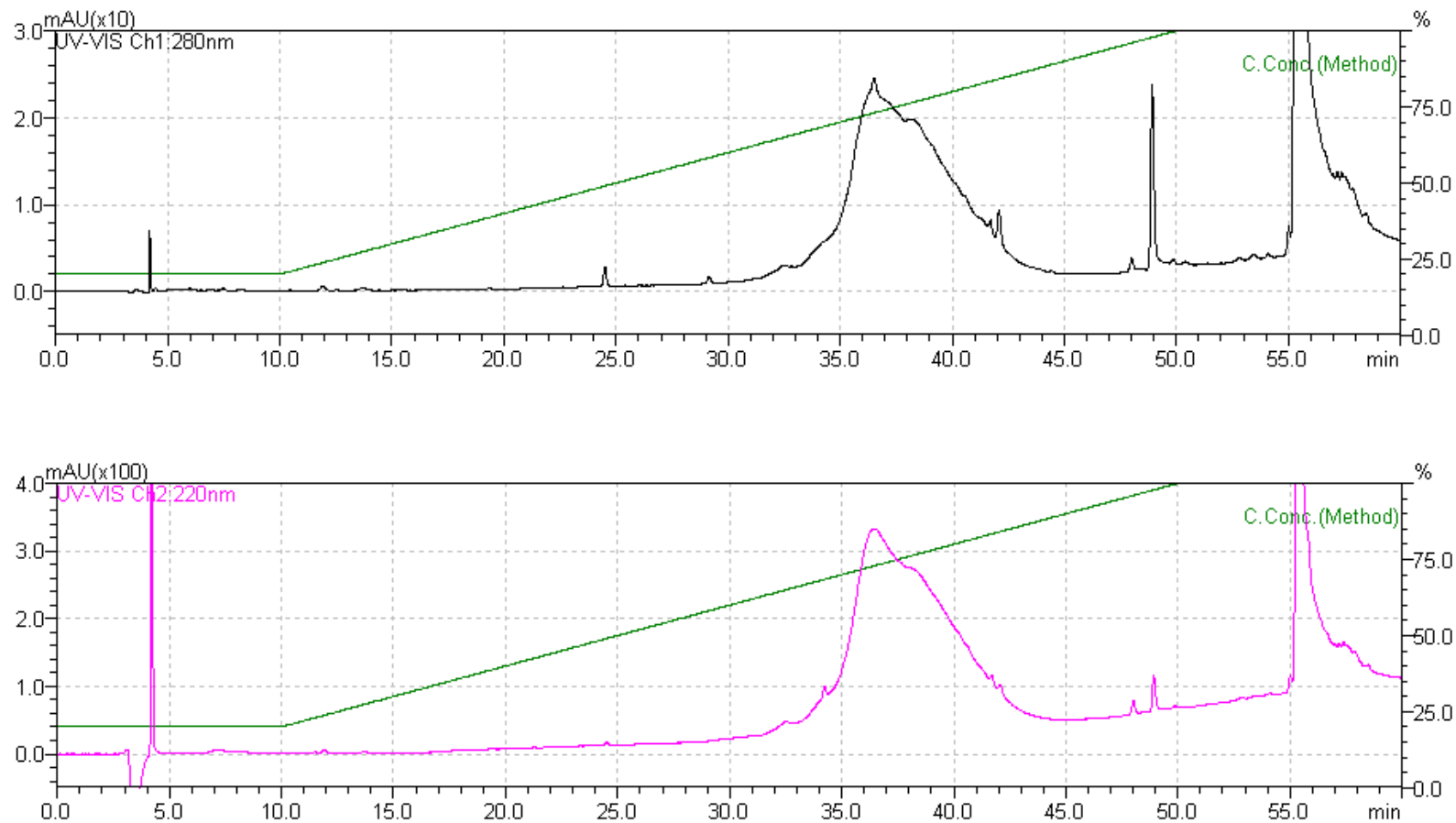


Figura 18, Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 da fração 37 proveniente de cromatografia de fase reversa, Coluna equilibrada com 20% de solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), perfazendo gradiente de 20 a 100% de acetonitrila (verde), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa), As frações 37 a 40 apresentaram atividade antagonista e as frações 37 e 38 foram encaminhadas para espectrometria de massa,

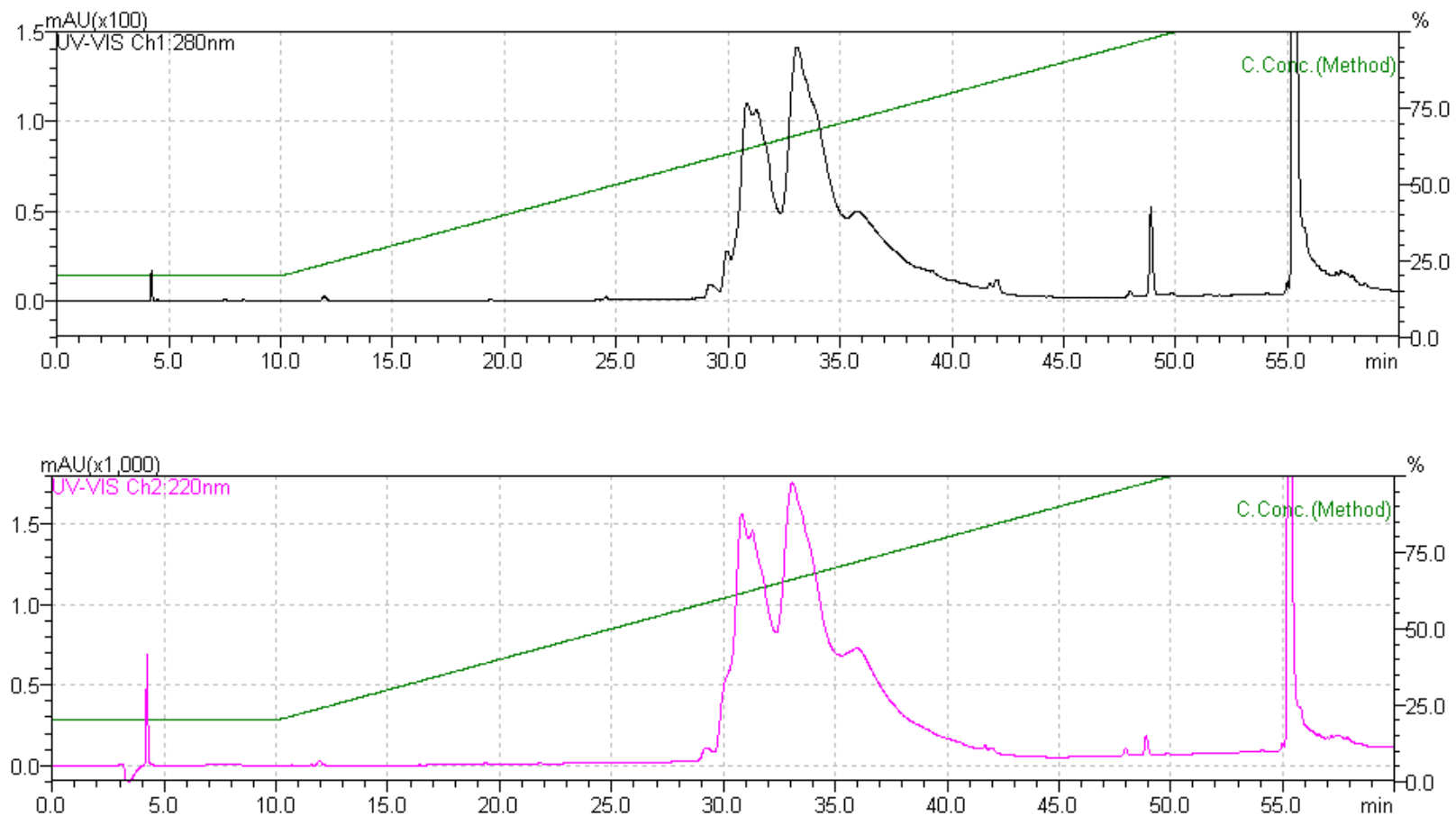
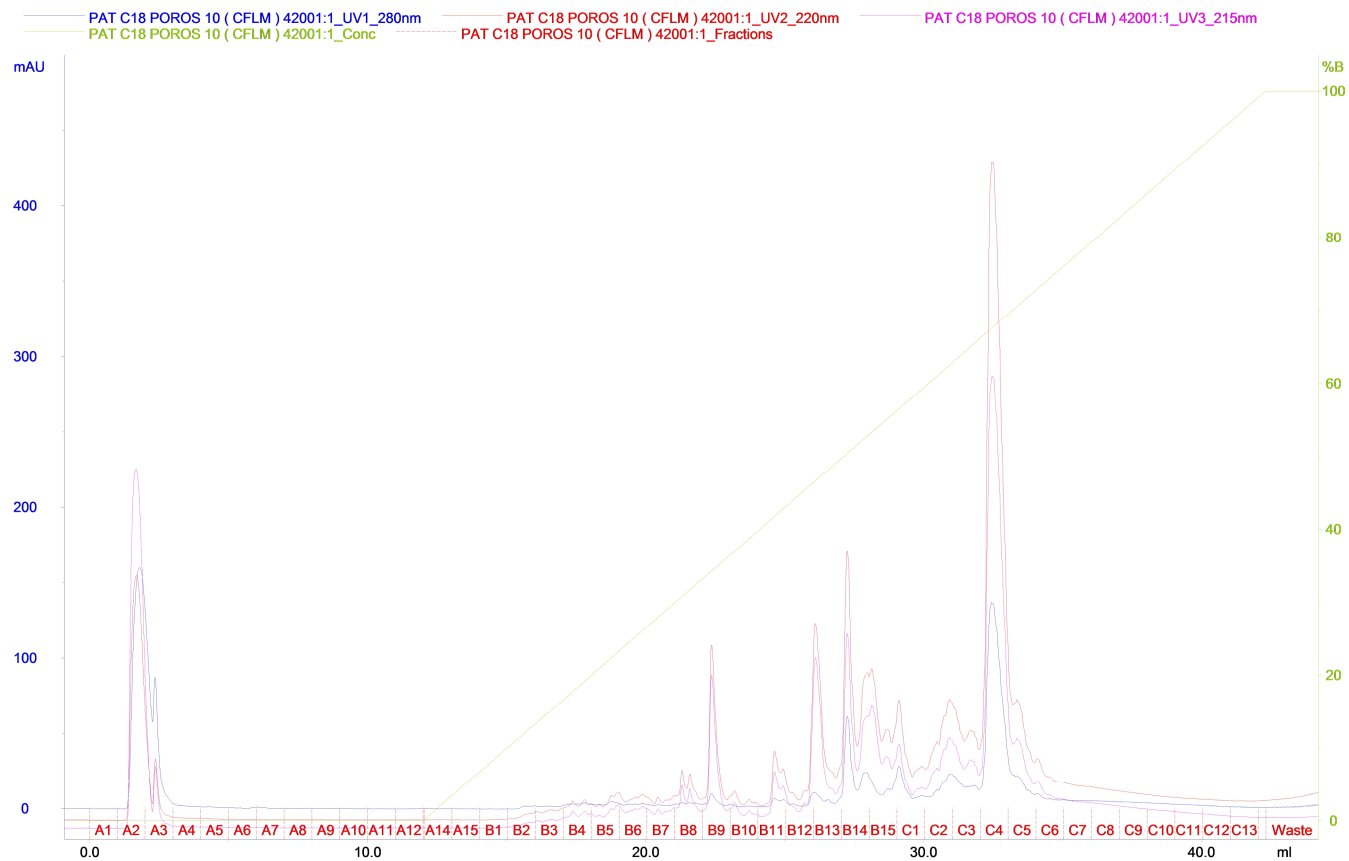


Figura 19, Cromatografia de fase reversa em coluna LC-18 das frações 33 e 34 provenientes de cromatografia de fase reversa, Coluna equilibrada com 20% de solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), perfazendo gradiente de 20 a 100% de acetonitrila (verde), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (preto) e 220 nm (rosa), As frações 34 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 34 a 37 foram encaminhadas para espectrometria de massa,



5 Figura 20, Cromatografia de fase reversa em coluna Poros[®] C18 do pico C,4 (fração 10) proveniente da cromatografia por exclusão molecular, Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%), Detecção do eluato monitorada a 280 nm (azul), 220 nm (vermelho) e 215 nm (rosa), Gradiente de acetonitrila de 0 a 100% (verde), As frações C1 a C10 apresentaram atividade antagonista e a fração C4 foi encaminhada para espectrometria de massa.

5.9 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A FIG. 24 apresenta as frações ativas originadas da *recromatografia* de fase reversa, as frações submetidas a espectrometria de massa e aquelas a partir das quais massas moleculares de íons puderam ser detectadas. Além destas, a fração C4 originada de uma única corrida cromatográfica de fase reversa foi encaminhada para espectrometria de massas.

A primeira análise pelo emprego da metodologia permitiu a detecção de moléculas apenas em quatro frações, indicadas na FIG. 25. As FIG. 26 a 30 apresentam o resultado da espectrometria de massa destas frações: 38, 38, 35, 35 e 36, letras (a), (b), (c), (c) e (d) da FIG. 25, respectivamente. A FIG. 31 apresenta o resultado referente à fração C4 obtida por meio de cromatografia de fase reversa (cromatografia I) do pico C.4 proveniente da cromatografia por exclusão molecular.

Numa segunda abordagem, foram detectadas diversas moléculas em cada uma das amostras [(a), (b) e (c+d)] analisadas (FIG. 25 e 32 a 42).

20

5.10 SEQUENCIAMENTO

Após tratamentos de redução, alquilação e tripisinólise, os fragmentos proteicos obtidos a partir das amostras (a), (b) e (c+d) [as amostras (b) e (c) foram tratadas juntas por apresentarem mesma massa molecular e, conseqüentemente, tratem-se, em tese, da mesma molécula] (FIG. 25), foram encaminhados para sequenciamento. Os QUADROS 1, 2 e 3 (ANEXOS A, B e C, respectivamente) apresentam, para cada amostra, as sequencias obtidas, massas moleculares e proteínas 100 % similares aos íons detectados.

30

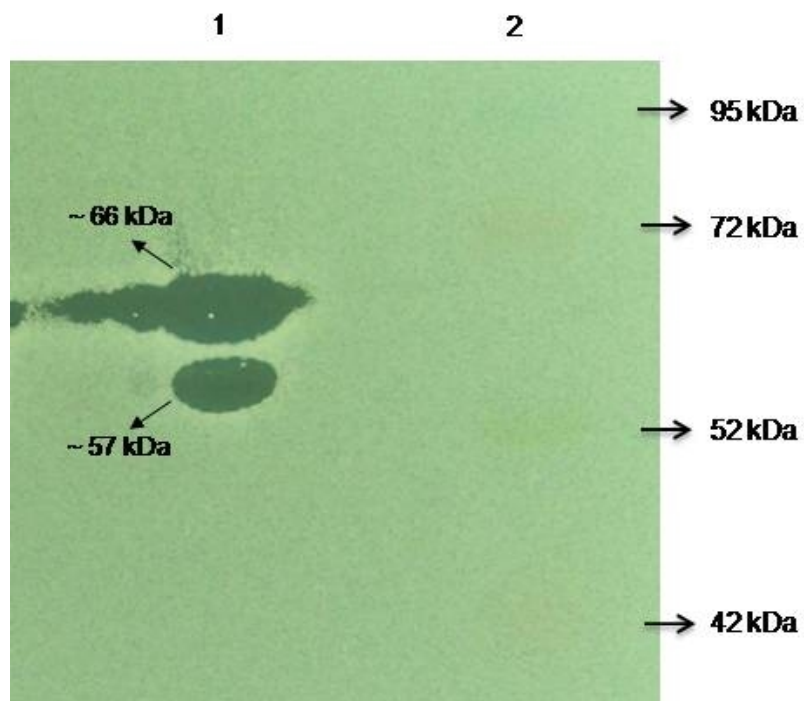


Figura 21. SDS-PAGE e revelação *in situ* da atividade antagonista do extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% contra *Shigella sonnei* SsR. 1. C75 e 2. Padrão de massa molecular pré-corado (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas).

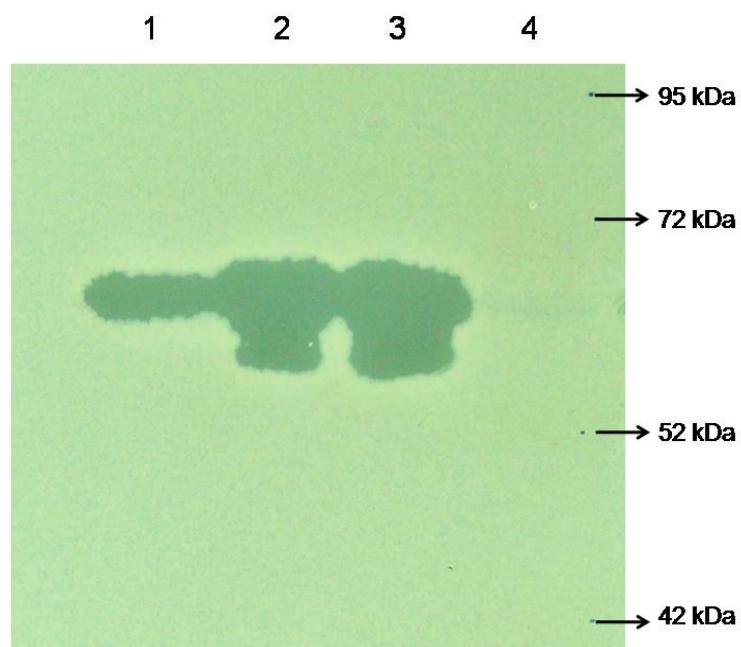


Figura 22. SDS-PAGE e revelação *in situ* da atividade antagonista das frações originadas da cromatografia de troca iônica do extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% contra *Shigella sonnei* SsR. 1. Pico C, *pool* das frações 15 e 16; 2. Pico B, *pool* das frações 13 e 14; 3. Pico A, *pool* das frações 1 a 5; e 4. 2. Padrão de massa molecular pré-corado (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas).

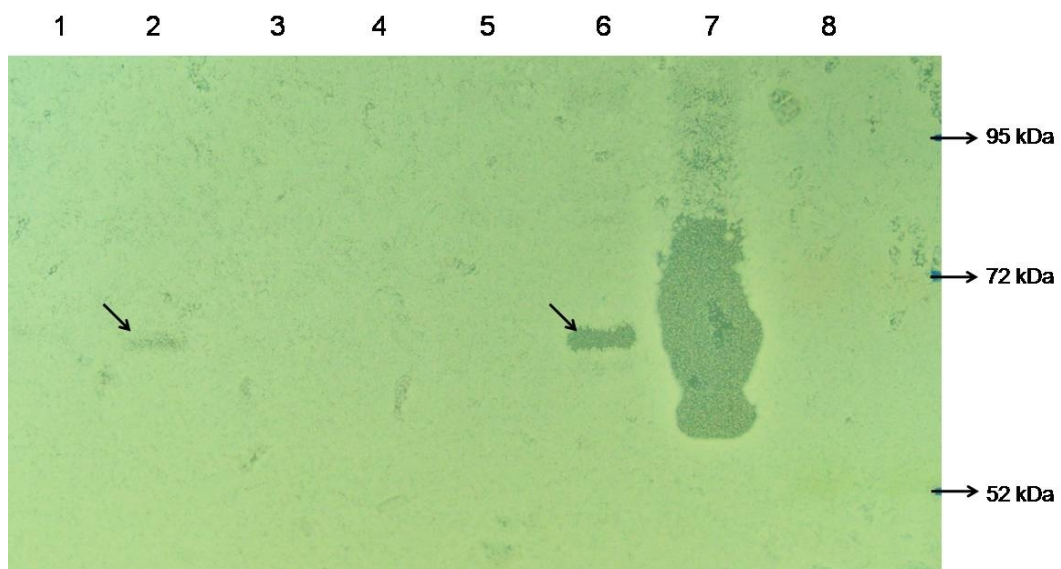


Figura 23. SDS-PAGE e revelação *in situ* da atividade antagonista dos picos ativos originados da cromatografia por exclusão molecular do pico C contra *Shigella sonnei* SsR. **1.** Pico C.5; **2.** Pico C.4; **3.** Pico C.3; **4.** Pico C.2; **5.** Pico C.1; **6.** Pico C; **7.** Extrato proteico intracelular precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturação de 75% (C75); e **8.** Padrão de massa molecular pré-corado (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas).

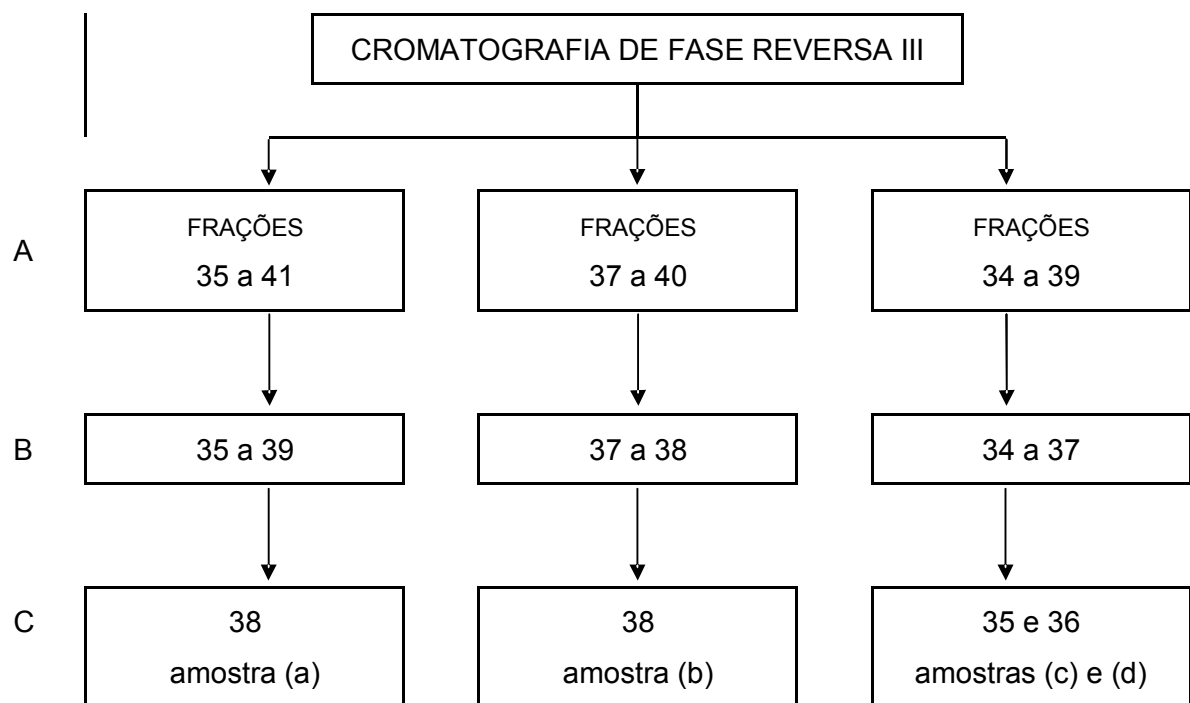


Figura 24. Espectrometria de massa - frações *recromatografadas*. A, frações ativas originadas da cromatografia de fase reversa; B, frações submetidas a espectrometria de massa; C, frações nas quais foram detectados íons.

Cromatografia de fase reversa				Espectrometria de massa	
Etapa	I	II	III	Primeira análise	Segunda análise
Coluna	C2/C18	LC-18	LC-18		
Acetonitrila	0 a 100%	0 a 100%	20 a 100%		
Amostra	Frações			Massa molecular (Da)	
(a)	B4 a B9	35	38	34.180,613	2.695,396 a 8.607,723
				38.875,863	
(b)	B4 a B9	37	38	34.461,712	2.695,957 a 8.615,086
				24.688,769	
(c)	B10 a B15	33 e 34	35	22.443,412	855,333 a 56.825,216
(d)			36	22.443,446	

Figura 25. Características das corridas cromatográficas de fase reversa, frações ativas encaminhadas para espectrometria de massa e massa molecular dos íons.

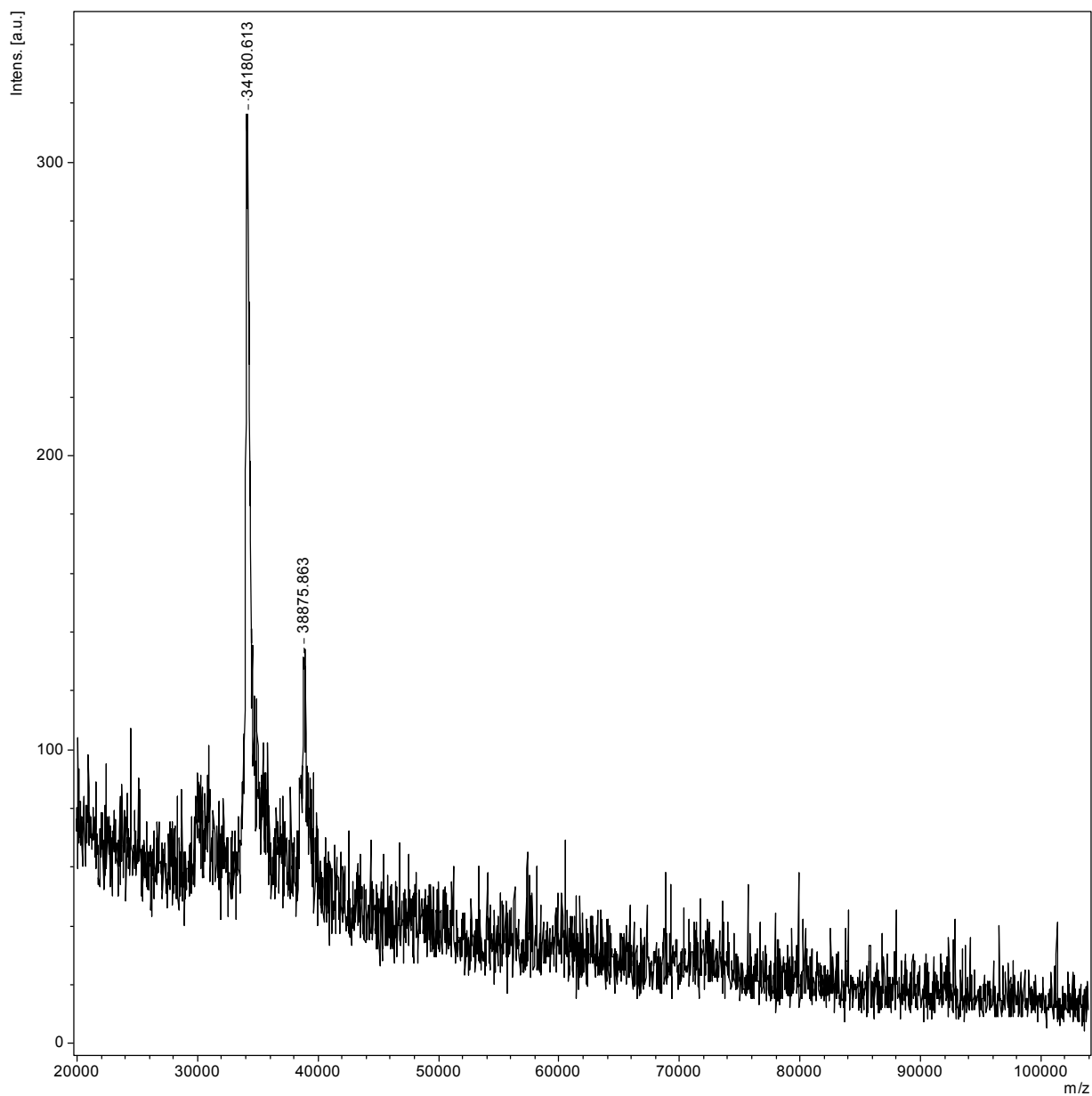


Figura 26. Espectrometria de massa em matriz DHB da fração 38 representada na figura 17 [letra (a) na FIG. 25]. Observa-se a presença de massas moleculares de 34.180,613 e 38.875,863 Da.

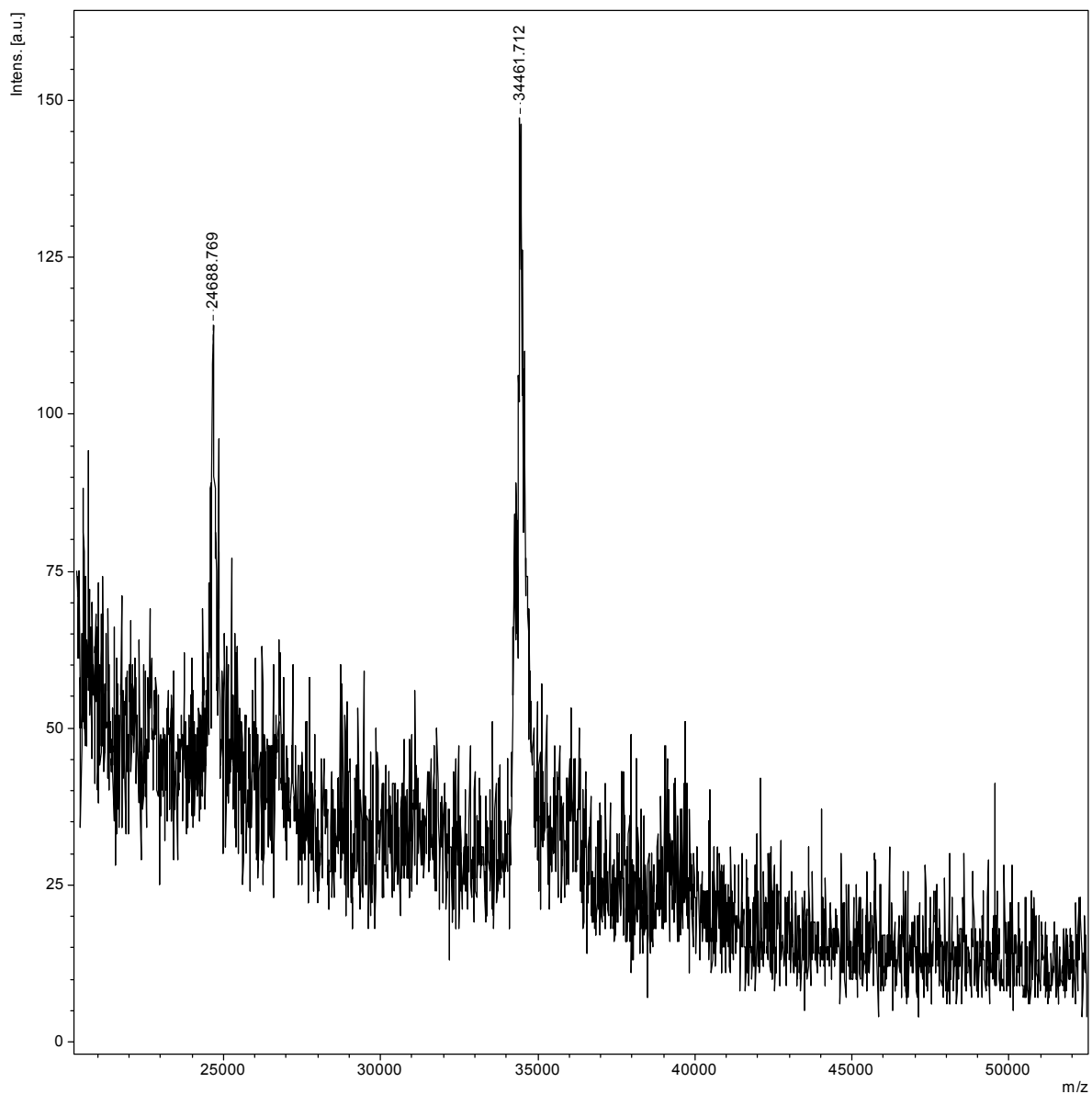


Figura 27. Espectrometria de massa em matriz DHB da fração 38 representada na figura 18 [letra (b) na FIG. 25]. Observa-se a presença de massas moleculares de 34.461,712 e 24.688,769 Da.

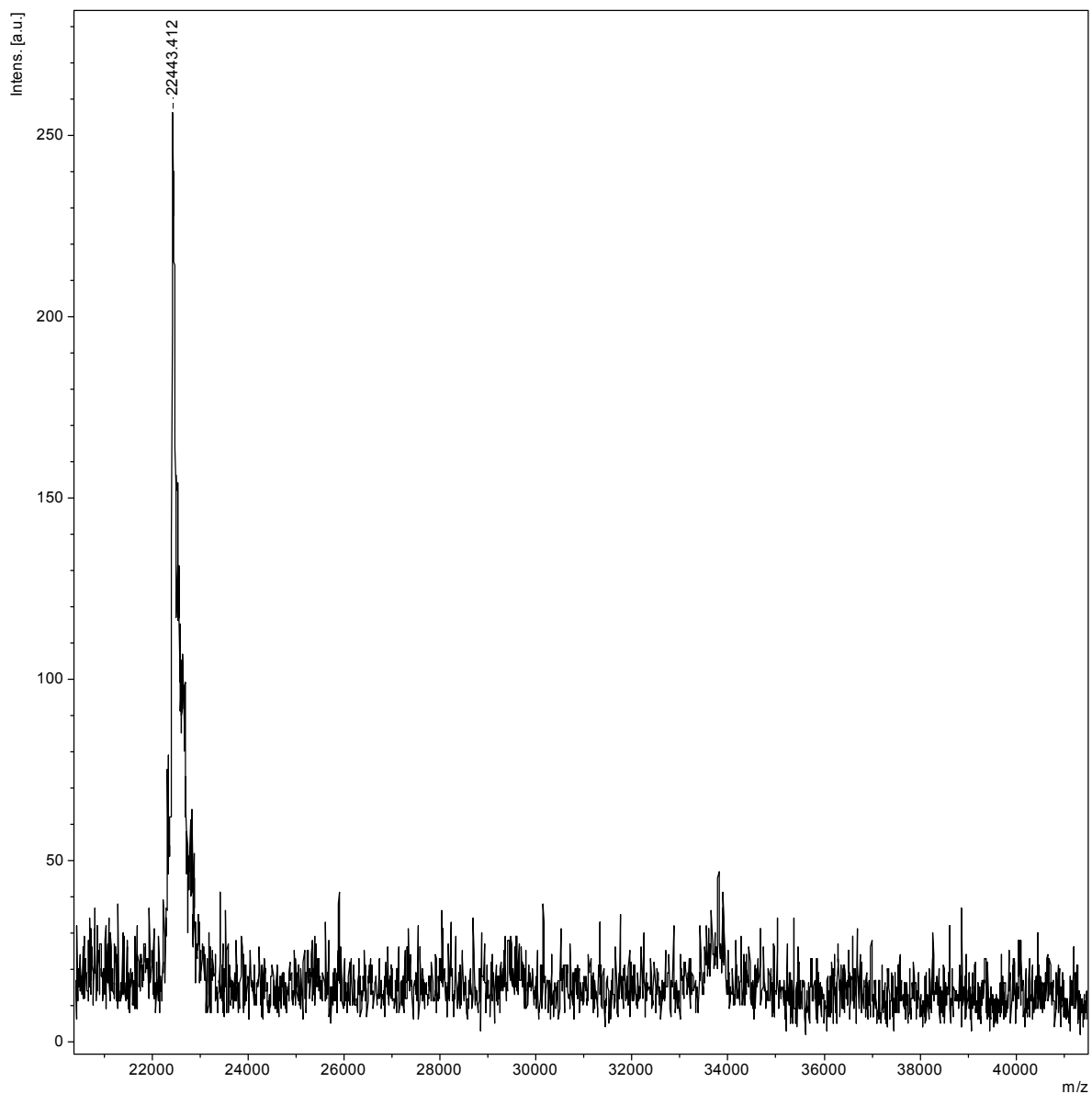


Figura 28. Espectrometria de massa em matriz DHB da fração 35 representada na figura 19 [letra (c) na FIG. 25]. Observa-se a presença apenas da massa molecular de 22.443,412 Da.

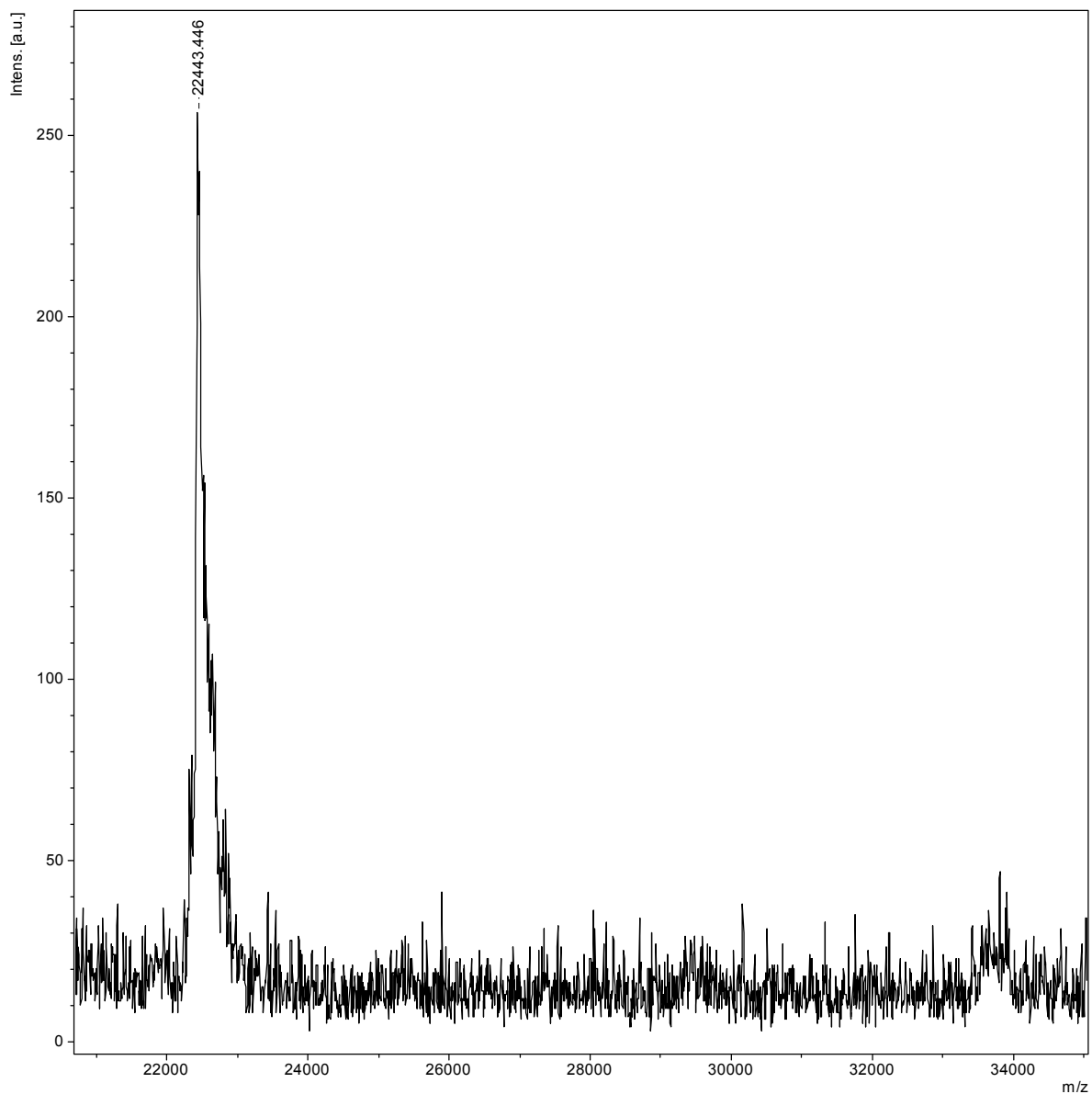


Figura 29. Espectrometria de massa em matriz ácido sinapínico da fração 35 representada na figura 19 [letra (c) na FIG. 25]. Observa-se a presença apenas da massa molecular de 22.443,446 Da.

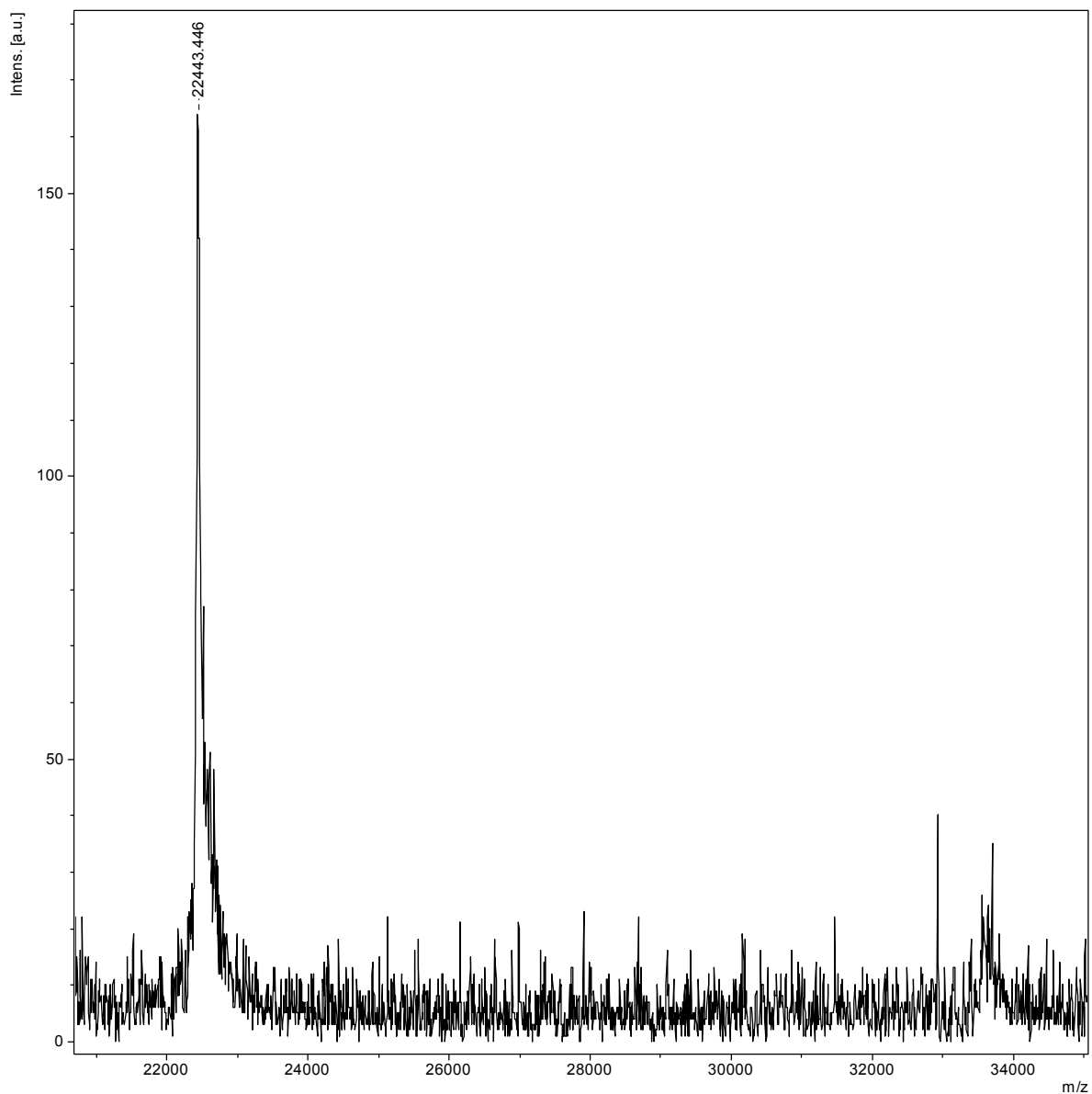


Figura 30. Espectrometria de massa em matriz ácido sinapínico da fração 36 representada na figura 19 [letra (d) na FIG. 25]. Observa-se a presença apenas da massa molecular de 22.443,446 Da.

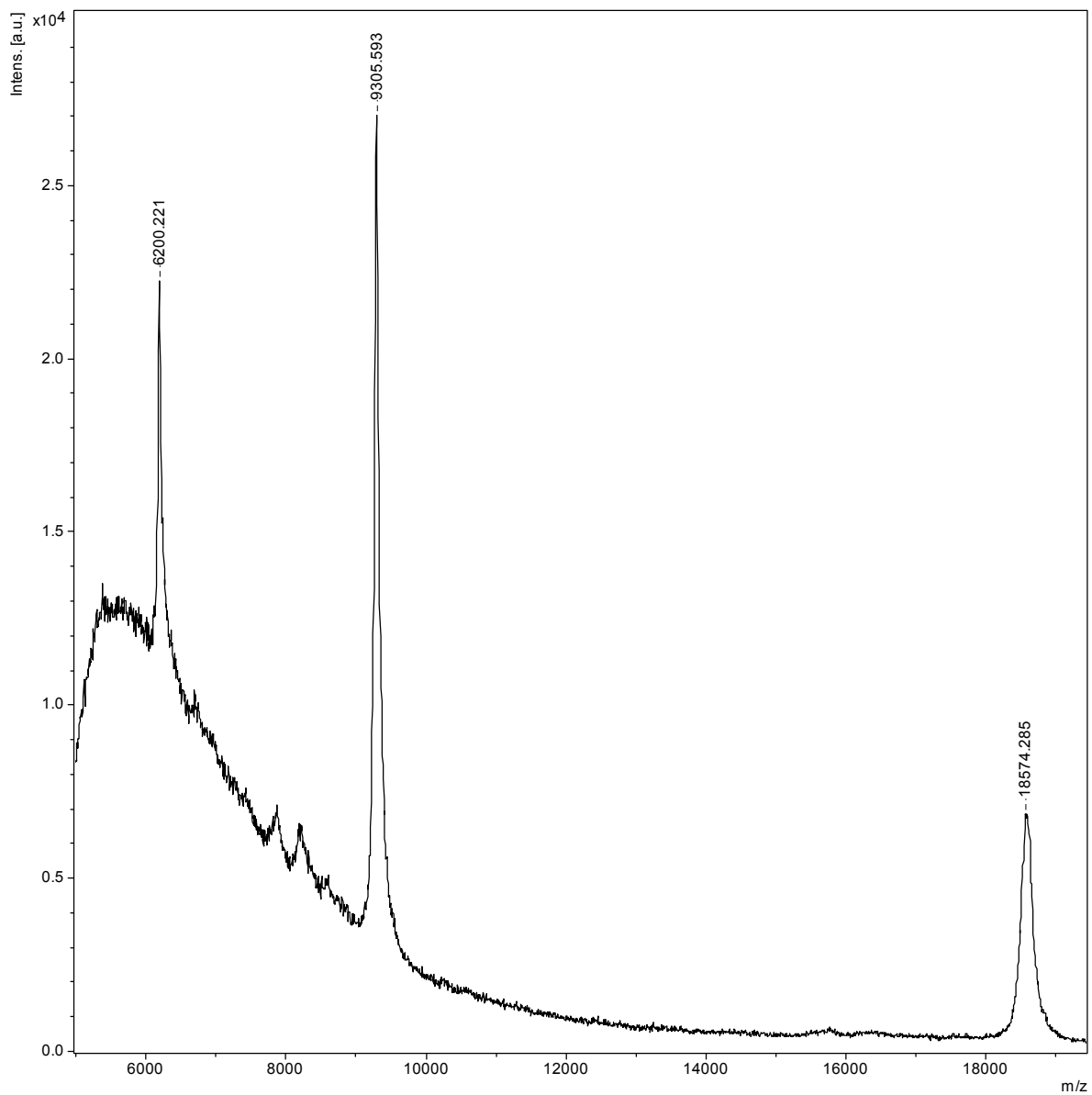


Figura 31. Espectrometria de massa da fração C4 representada na figura 20. Observa-se a presença de molécula de 18.574,285 Da.

5.11 AVALIAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Os resultados da busca por similaridade entre os peptídeos sequenciados na amostra (a) e proteínas já descritas para *Shigella* depositadas no banco de dados BLAST demonstraram identidade de 100% entre peptídeos e cinco proteínas, a saber frutose bisfosfato aldolase classe II, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, formato acetiltransferase 1, cisteína sintetase A e fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Os resultados estão descritos no QUADRO 1 (ANEXO A). Não foi observada similaridade significativa entre peptídeos sequenciados neste estudo e bacteriocinas depositadas no BACTIBASE.

Na amostra (b), foi observada similaridade entre os fragmentos obtidos e 8 proteínas descritas para *Shigella* (QUADRO 2, ANEXO B). Dentre estas, 6 apresentaram mais de um fragmento correspondente: frutose bisfosfato aldolase classe II, gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, seril-tRNA sintetase, formato aciltransferase, cisteína sintetase A e fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Não foi observada similiaridade entre os peptídeos presentes na amostra (b) e bacteriocinas incluídas no banco de dados BACTIBASE.

No que se refere à amostra (c+d), detectou-se similaridade entre 24 proteínas descritas para *Shigella* (QUADRO 3, ANEXO C), 10 das quais apresentaram mais de um fragmento correspondente. São elas: purina nucleosídeo fosforamidase, glicose-1-fosfatase, frutose bisfosfato aldolase classe II, cisteína sintetase A, glicose-1-fosfatase/inositol fosfatase, proteína ligadora de DNA h-ns, glutaredoxina-4, subunidade alfa do fator hospedeiro de integração, esterase YeiG e S-ribosil-homocisteína liase. Cinco fragmentos detectados apresentaram similaridade com “proteínas hipotéticas” de *Shigella*, ou seja, proteínas cujas sequências foram inferidas pelo genoma sequenciado, mas que não apresentam função conhecida. Também não foi observada similiaridade entre os peptídeos presentes na amostra (c+d) e bacteriocinas incluídas no banco de dados BACTIBASE.

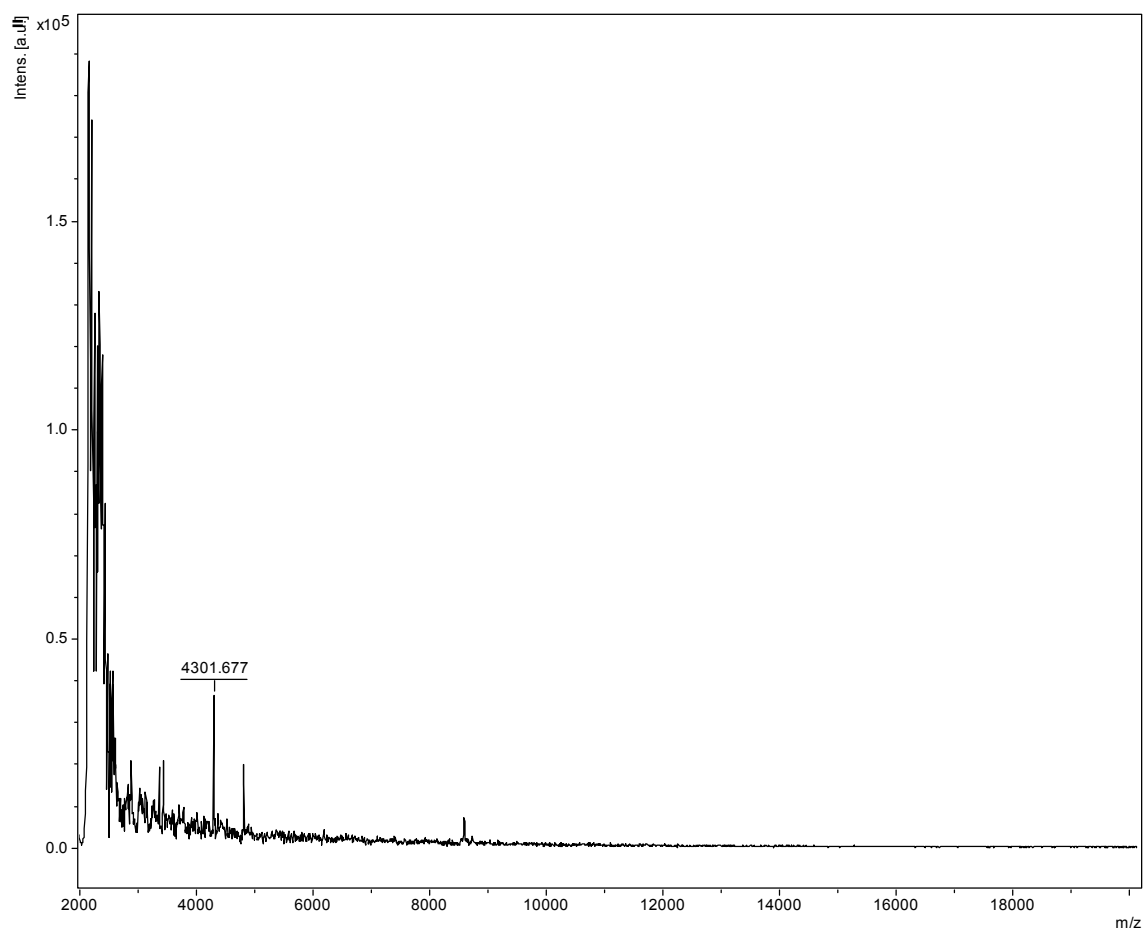


Figura 32. Espectrometria de massa da amostra (a) em matriz alfaciano. Método LP 12 kDa.

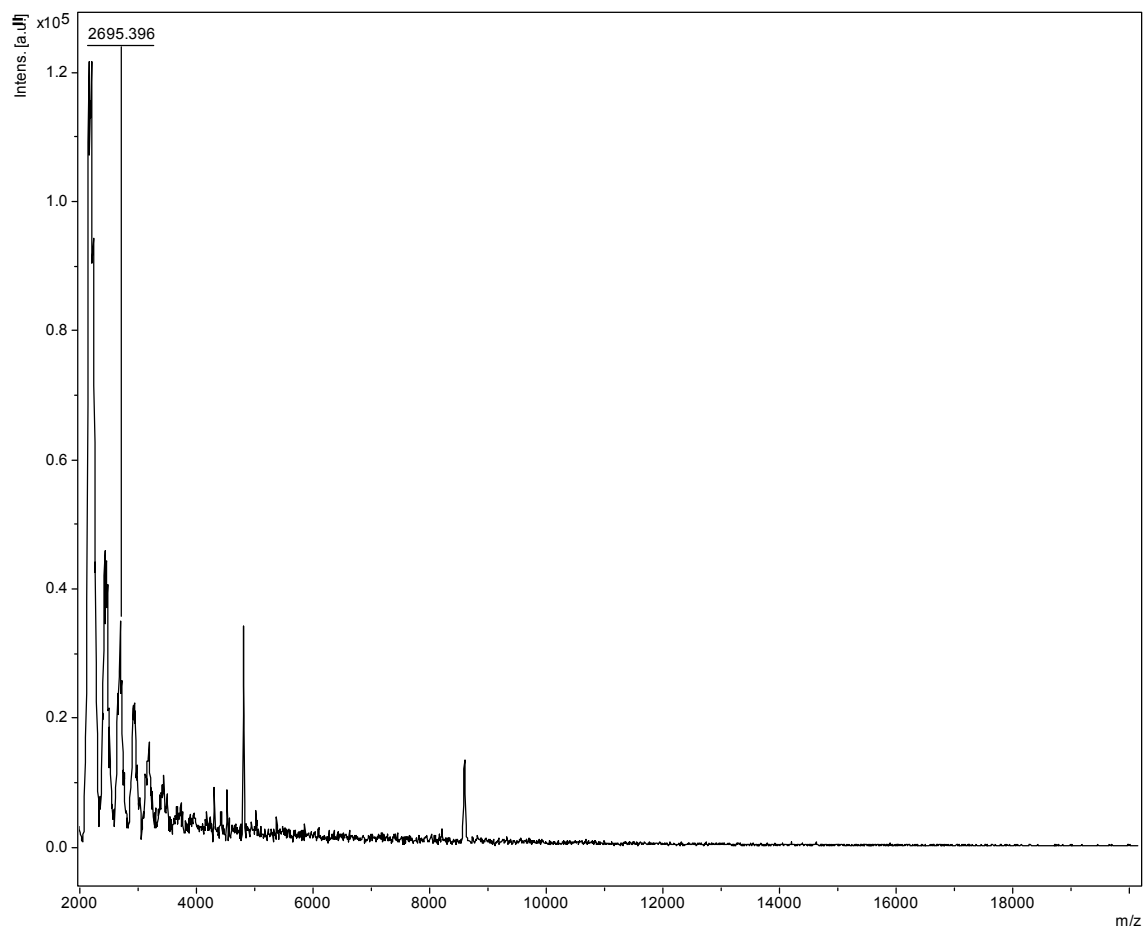


Figura 33. Espectrometria de massa da amostra (a) em matriz ácido sinapínico.
Método LP 12 kDa.

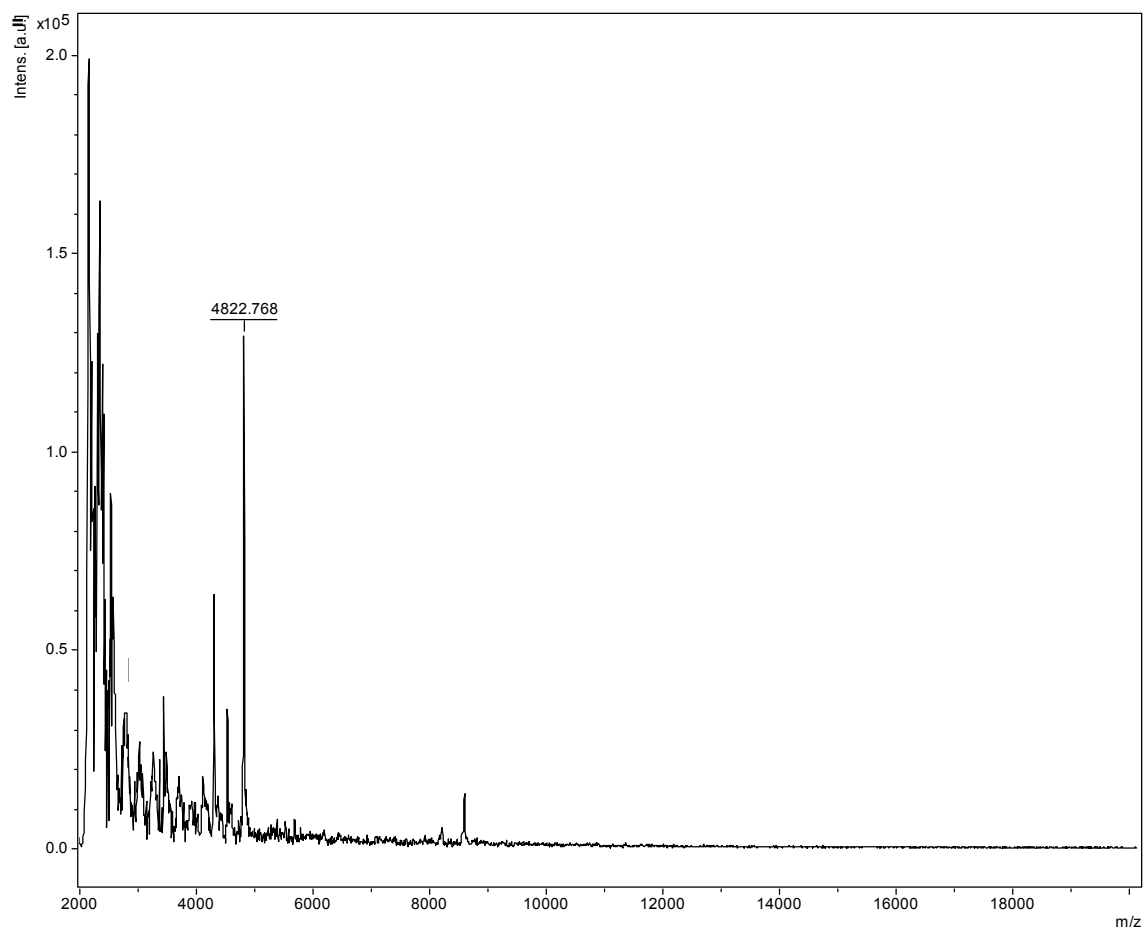


Figura 34. Espectrometria de massa da amostra (b) em matriz alfaciano. Método LP 12 kDa.

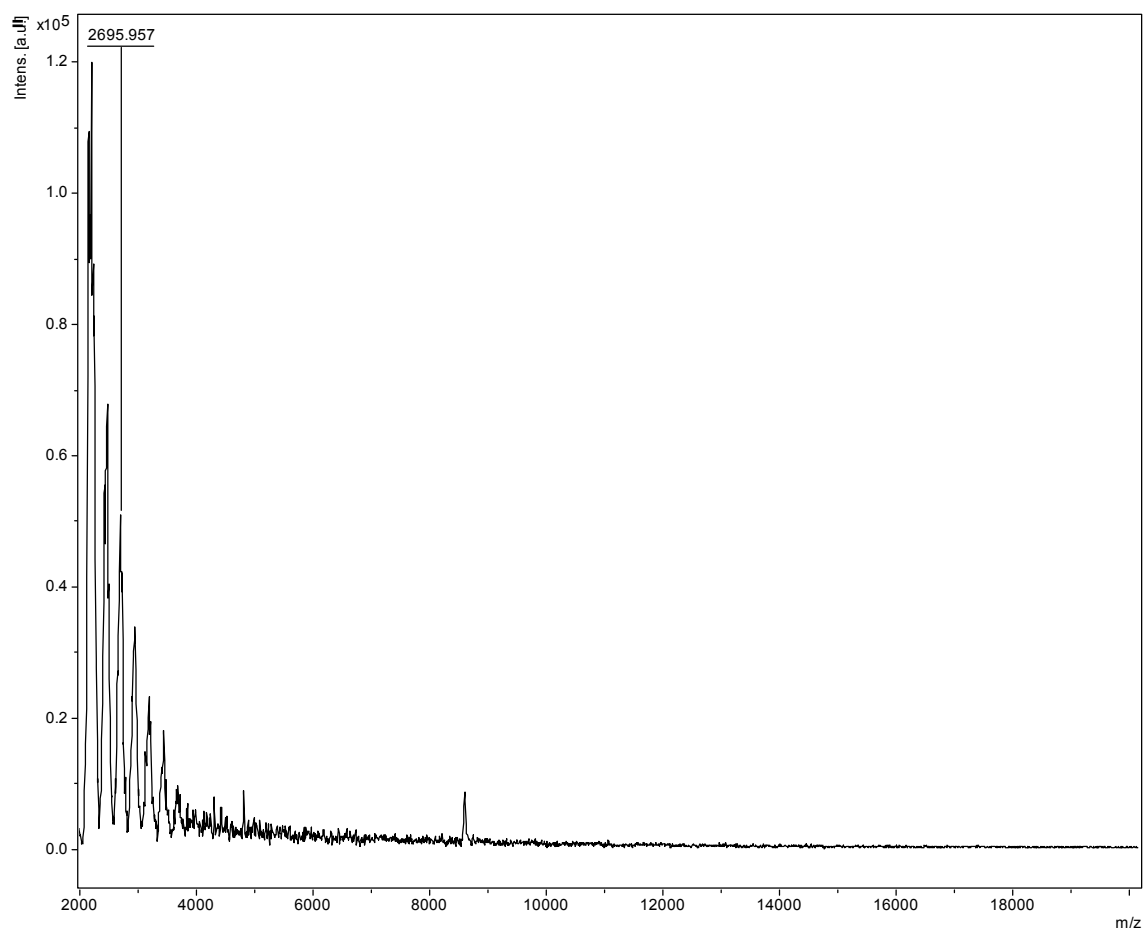


Figura 35. Espectrometria de massa da amostra (b) em matriz ácido sinapínico.
Método LP 12 kDa.

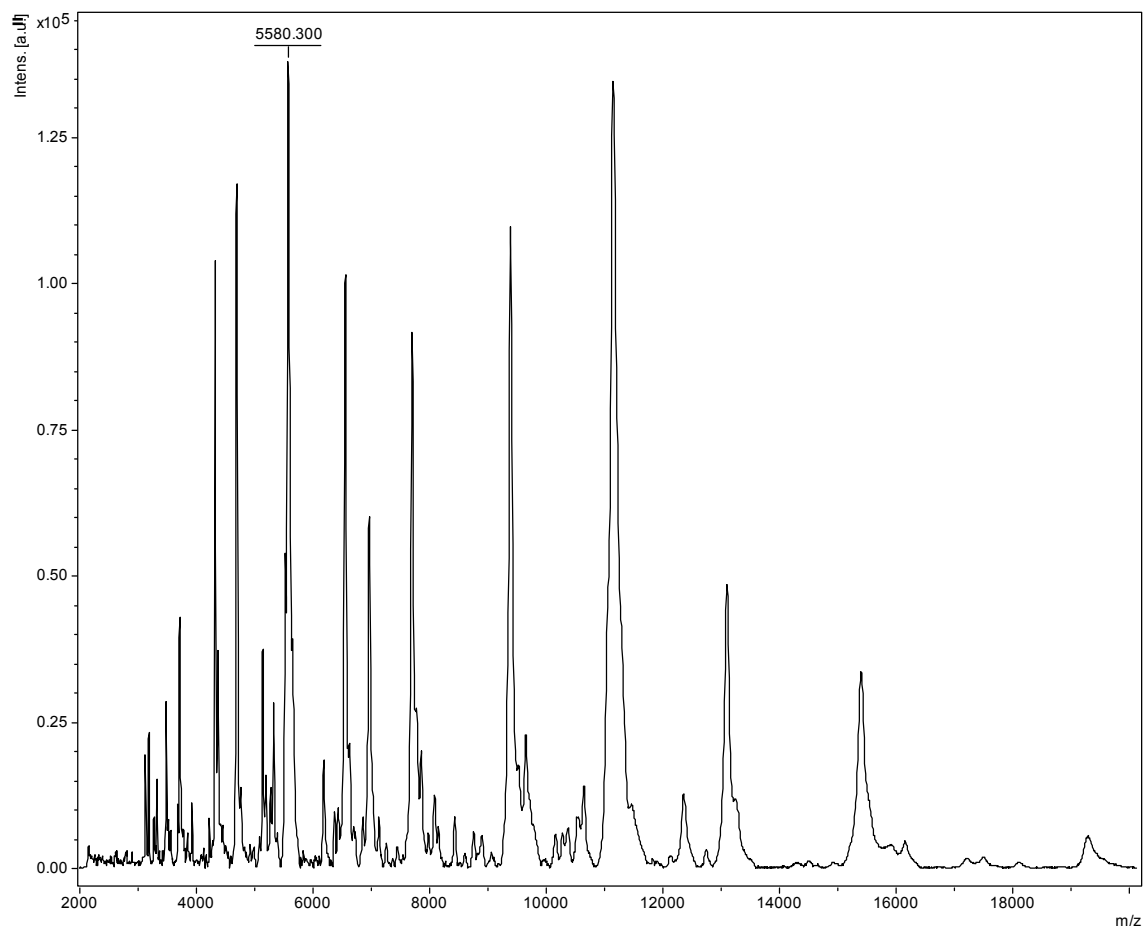


Figura 36. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LP 12 kDa.

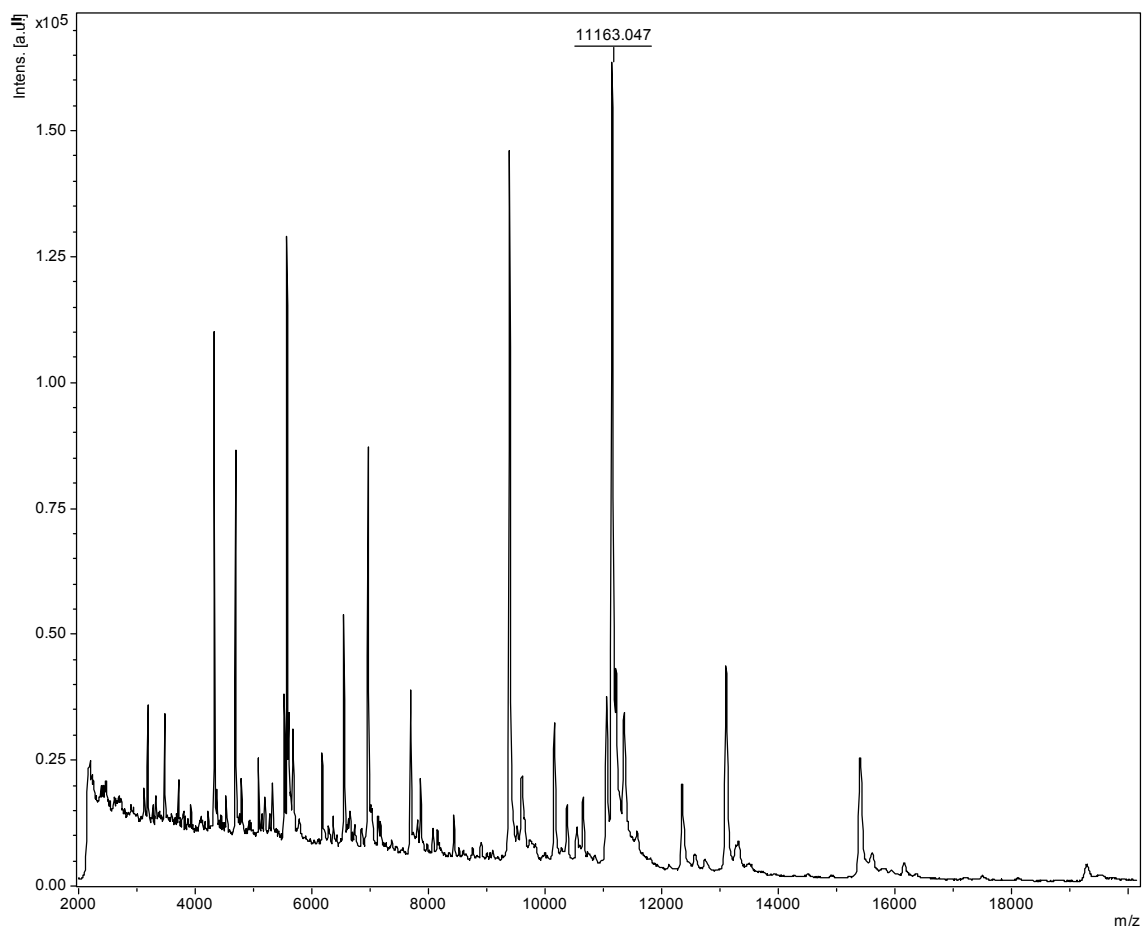


Figura 37. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico.
Método LP 12 kDa.

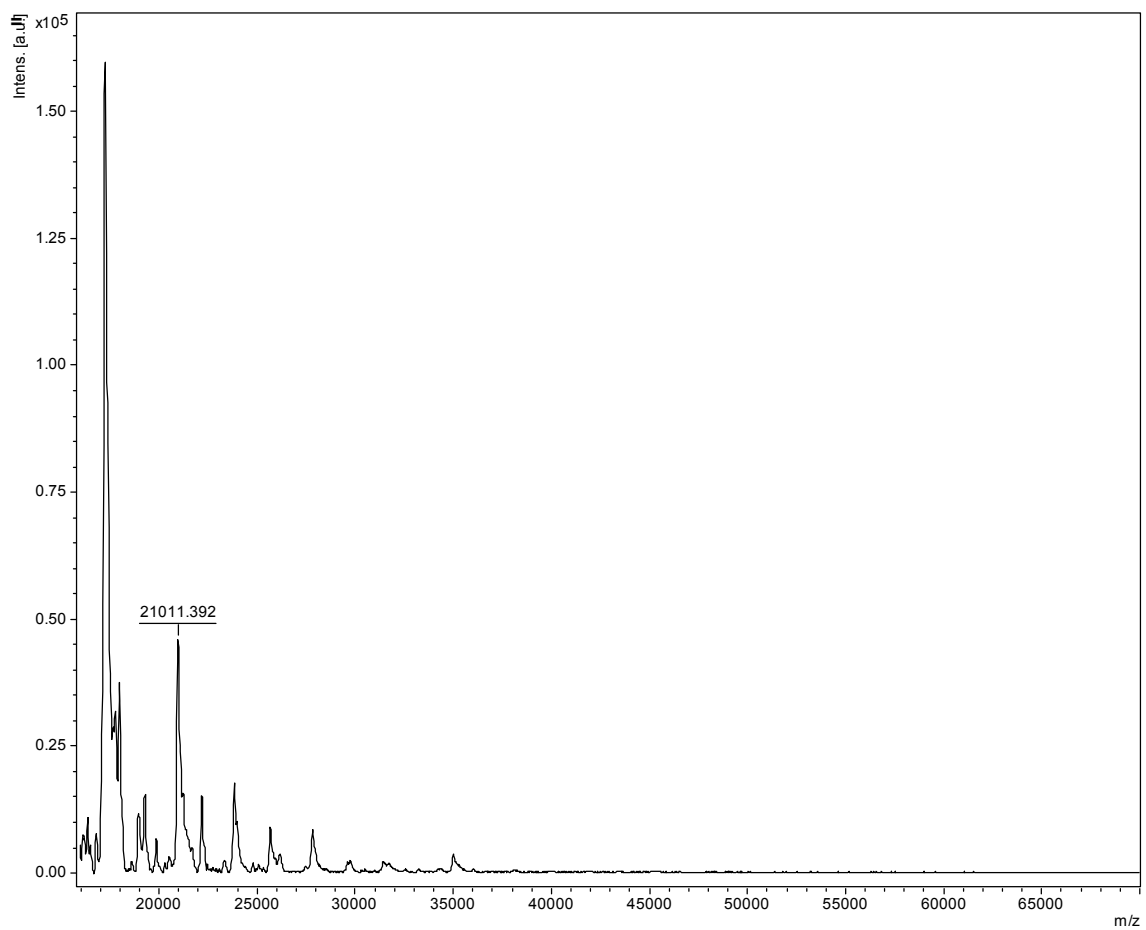


Figura 38. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LP 44 kDa.

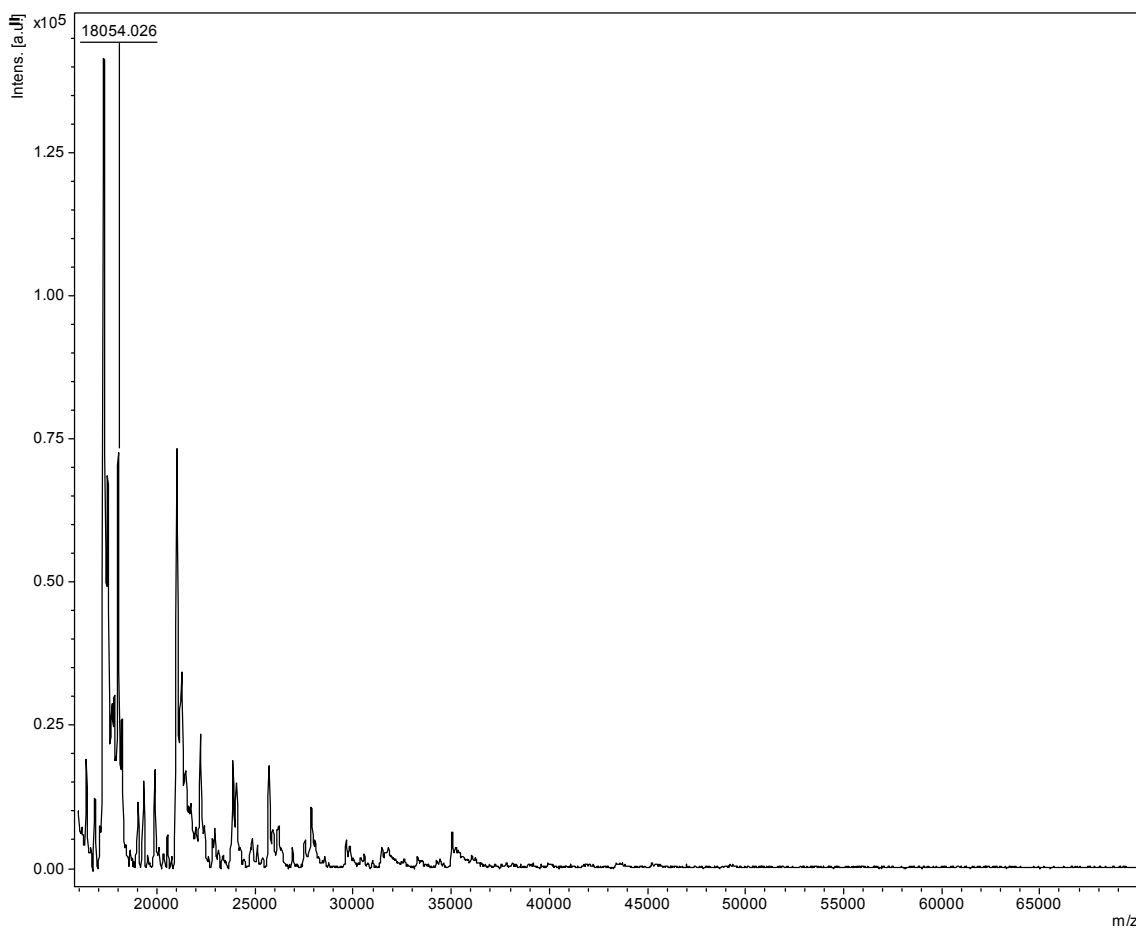


Figura 39. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico.
Método LP 44 kDa.

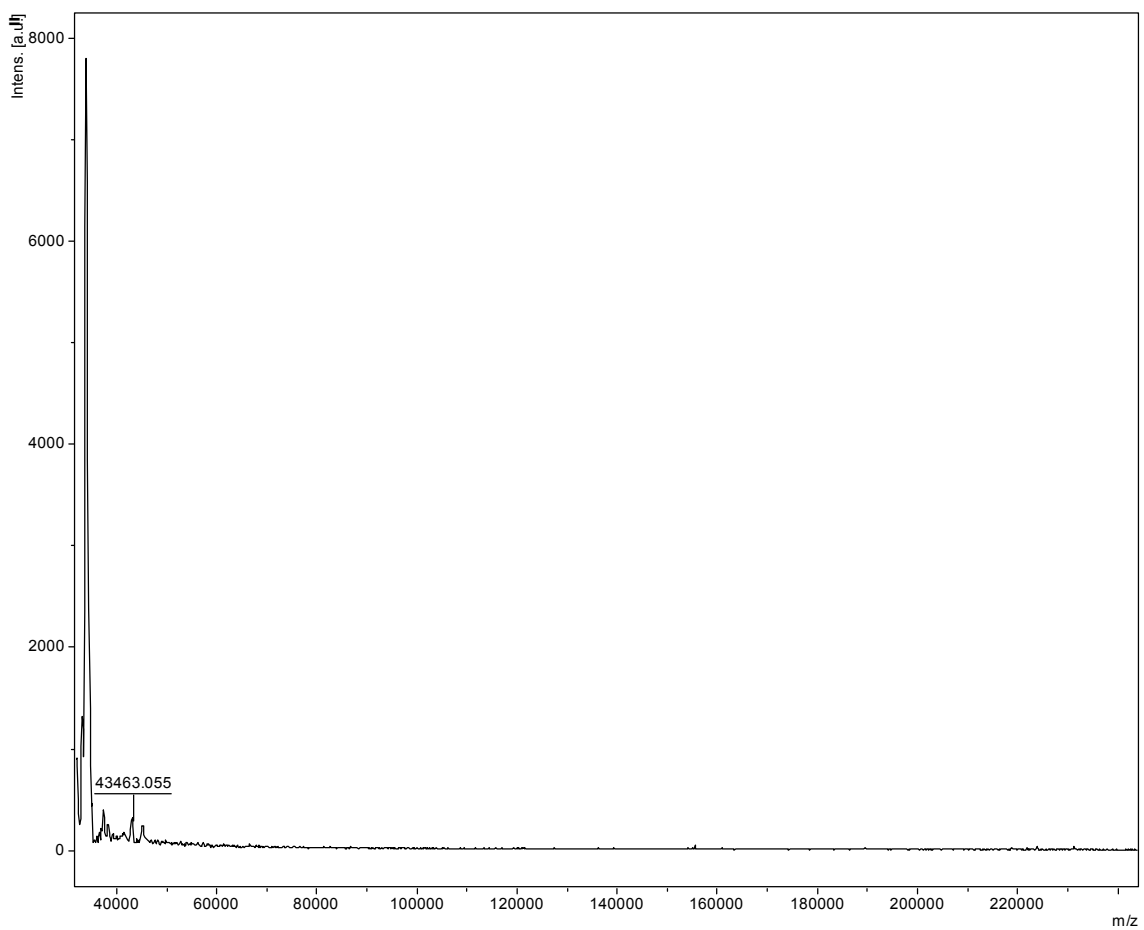


Figura 40. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LP 66 kDa.

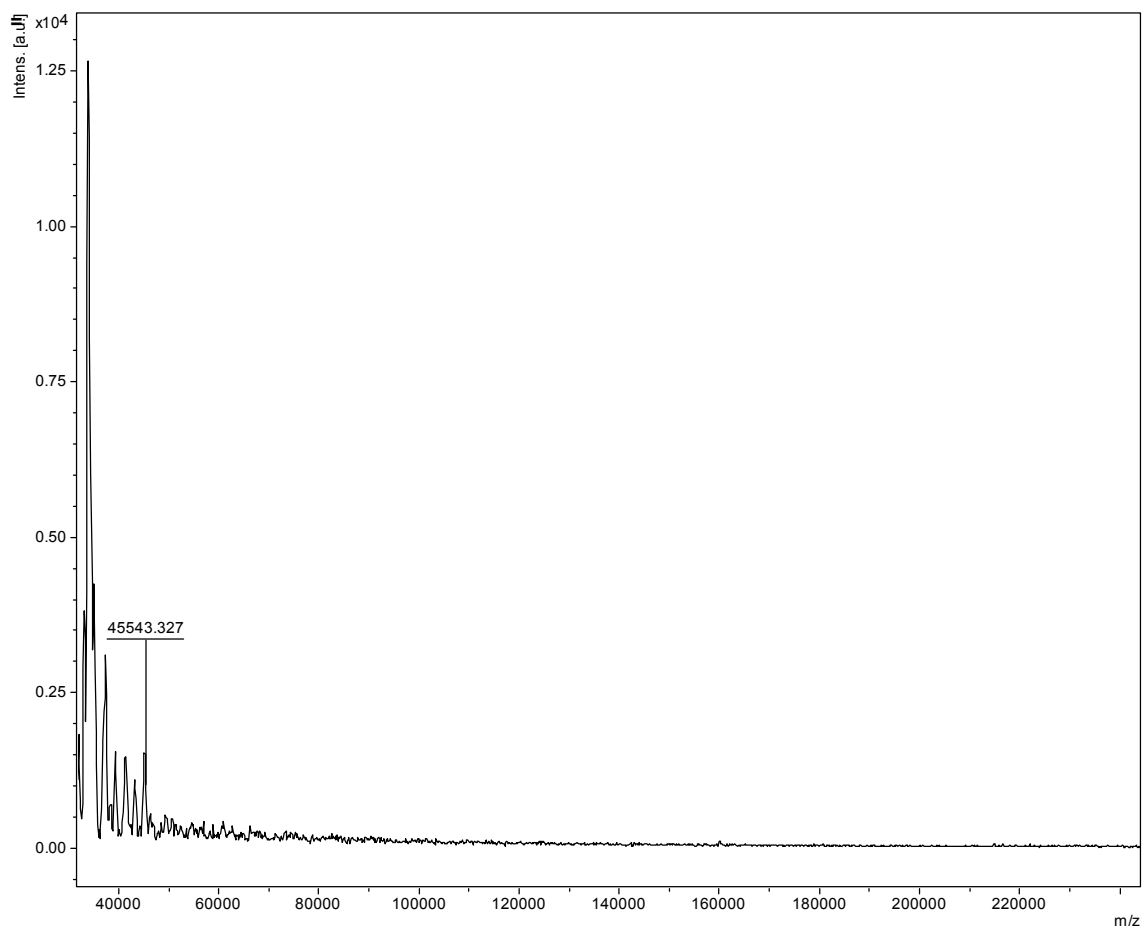


Figura 41. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz ácido sinapínico.
Método LP 66 kDa.

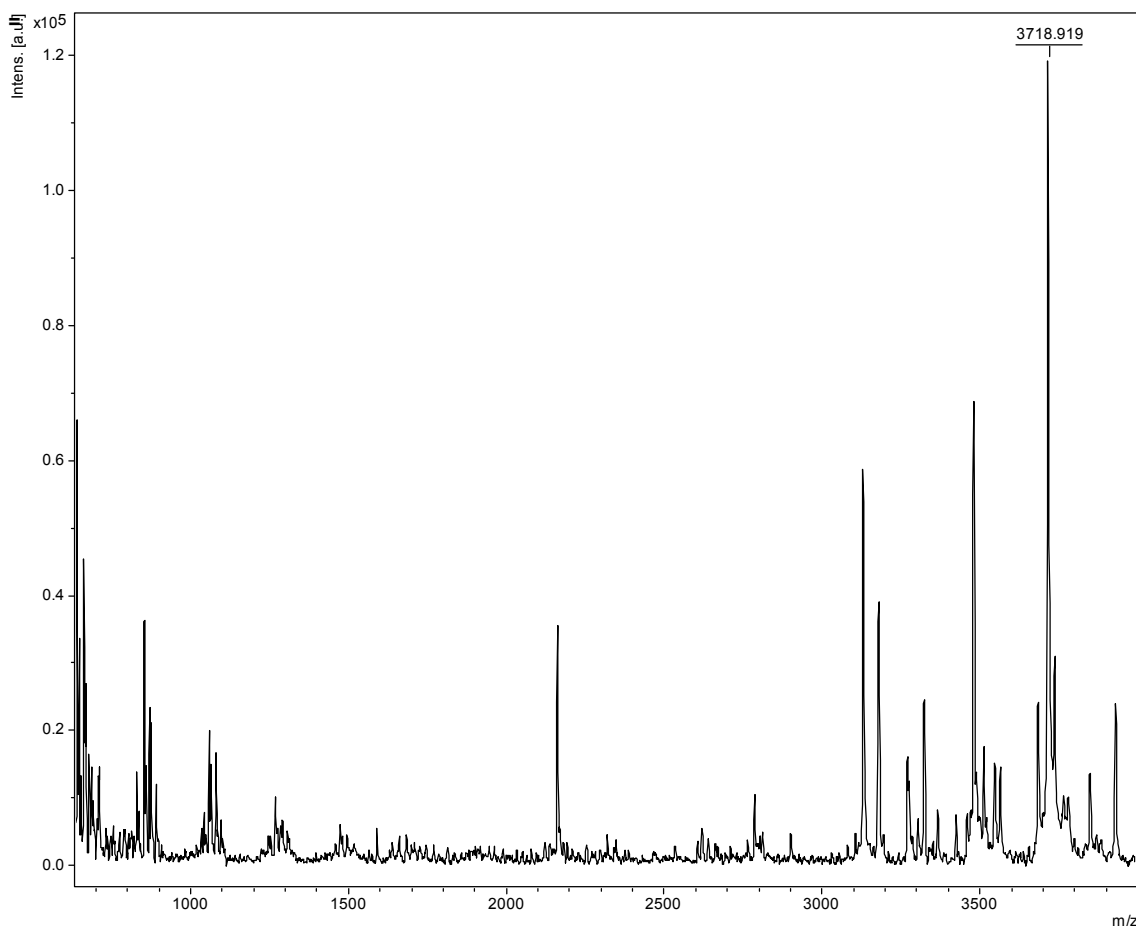


Figura 42. Espectrometria de massa da amostra (c) em matriz alfaciano. Método LPepMix.

6 DISCUSSÃO

5 *Shigella* é um gênero bacteriano incluído na família Enterobacteriaceae, que abriga quatro espécies, todas elas clinicamente relevantes para o ser humano. O grupo, predominantemente *S. flexneri* e *S. sonnei*, está associado à etiopatogenia da enterite aguda, sendo responsável por mais de 120 milhões de casos da doença e por cerca de um milhão de mortes anualmente (FEIL, 2012). A
10 bactéria expressa inúmeros fatores de virulência, responsáveis pelos diversos processos de lesão ao epitélio intestinal, que induzem resposta inflamatória marcante, característica da shigelose (PARSOT, 2005; NAVANEETHAN & GIANNELLA, 2011).

Os microrganismos apresentam a habilidade de síntese de uma série de
15 substâncias de defesa, muitas das quais agem diretamente sobre outros organismos, contribuindo para a permanência ou estabelecimento desses, especialmente, em ambientes densamente colonizados. Dentre eles, podemos citar lisozimas, ácido láctico, diversas exotoxinas, antibióticos e bacteriocinas, objeto deste estudo. A produção de bacteriocinas já foi descrita para uma enorme
20 gama de bactérias, inclusive *Shigella* (RILEY, 2009).

O potencial antimicrobiano das bacteriocinas desperta grande interesse, tanto na área básica, considerando-se a relevância da substância nas relações interbacterianas, como na área aplicada, em decorrência de seu potencial de aplicação biotecnológico. Bacteriocinas têm sido consideradas alternativas a
25 drogas antimicrobianas clássicas e conservantes de alimentos. Consequente à crescente disseminação de resistência a antibióticos, o estudo de antimicrobianos alternativos é premente, tanto para a medicina humana como veterinária (PIETERSE & TODOROV, 2010).

Bactérias produtoras de bacteriocinas podem ser encontradas nos mais
30 diversos ambientes, como solo, produtos alimentícios e hospedeiros animais. Admitindo-se que estas moléculas representam vantagem competitiva para as células produtoras, inclusive, possibilitando a invasão pelas mesmas de comunidades bacterianas complexas e estáveis, a expressão de bacteriocinas

deve ser considerada uma habilidade de virulência (SABIA *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que amostras de *E. coli* isoladas de infecções do trato urinário apresentam mais frequentemente a habilidade de sintetizar algumas bacteriocinas, como a microcina H47 e a colicina E1, indicando
5 que elas podem estar diretamente envolvidas na virulência do microrganismo (SMAJS *et al.*, 2010). Outros estudos também apontam microcinas como fatores de virulência de amostras de *E. coli* uropatogênicas (AZPIROZ *et al.*, 2009; BUDIC *et al.*, 2011).

Merecem destaque, ainda, algumas bacteriocinas produzidas por
10 bactérias Gram positivas, que agem diretamente como fatores de virulência. É o caso, por exemplo, da citolisina. Produzida por amostras de *Enterococcus*, este lantibiótico apresenta atividade contra um amplo espectro de tipos celulares, incluindo bactérias Gram positivas e várias células eucariotas, tais como eritrócitos humanos, bovinos e equinos, células da retina, leucócitos
15 polimorfonucleares e células epiteliais do intestino humano. Também é conhecida a estreptolisina S, bacteriocina envolvida em infecções invasivas por algumas amostras de *Streptococcus* do grupo A (COTTER *et al.*, 2005; COX *et al.*, 2005; DATTA, *et al.*, 2005).

Considerando-se o exposto, acreditamos não faltar argumentos que
20 justifiquem a relevância do estudo de bacteriocinas, em especial, daquelas produzidas por agentes de doenças infecciosas. Entre eles, como já discutido anteriormente, merece destaque o gênero *Shigella*.

Como mencionado, a produção de bacteriocinas já foi relatada para
25 membros do gênero *Shigella*. Entretanto, estudos que incluem purificação e caracterização da substância são bastante escassos. Dentre as colicinas já descritas para *Shigella*, merecem destaque as colicinas U e Js (SMARDA *et al.*, 1987; SMAJS *et al.*, 1997; SMAJS & WEINSTOCK, 2001; CASCALES *et al.*, 2007).

A colicina JS, inicialmente descrita para *S. sonnei*, é frequentemente
30 detectada em estudos epidemiológicos. Apresenta massa molecular de 10,4 kDa e sequência de 95 aminoácidos, sem similaridade com outras colicinas (SMARDA *et al.*, 1987; SMAJS & WEINSTOCK, 2001; CASCALES *et al.*, 2007). A colicina U, por sua vez, foi inicialmente descrita para *S. boydii* e apresenta sequência de 619

aminoácidos. Esta bacteriocina apresenta grande similaridade com colicinas cujo mecanismo de ação é a formação de poros (SMAJS *et al.*, 1997; CASCALES *et al.*, 2007).

5 Nesta investigação, apresentamos dados referentes à caracterização de uma bacteriocina produzida por uma amostra de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com diarreia aguda. Em estudos prévios, conduzidos pelo nosso grupo, realizamos a pesquisa de atividade antagonista pela bactéria (SOUSA, 2010; SOUSA *et al.*, 2011) e, após detecção de expressão de antagonismo, procedemos à avaliação da natureza do fenômeno e a caracterização preliminar
10 de substância(s) antagonista(s) sintetizada(s) pela amostra produtora SsP, empregada neste estudo (OLIVEIRA, 2010).

As etapas iniciais deste projeto incluíram a confirmação da expressão de antagonismo pela amostra de *S. sonnei* selecionada. Os resultados foram coincidentes com aqueles resultantes do nosso estudo prévio (OLIVEIRA, 2010).
15 Foi observada atividade antagonista contra a amostra reveladora *S. sonnei* SsR dos mesmos extratos proteicos, quais sejam, C30, C75 e S75. O extrato intracelular obtido por saturação com 75% de sulfato de amônio (C75) já havia sido anteriormente selecionado por apresentar maior título de atividade antagonista. A observação de título de atividade superior para uma fração
20 intracelular em comparação com uma fração extracelular pode ser explicada pela concentração da bacteriocina mais elevada no interior da célula bacteriana, antes de sua secreção. Adicionalmente, uma vez no ambiente extracelular, a bacteriocina é diluída no caldo de cultura e pode, ainda, sofrer degradação por proteases ou outros fatores incompatíveis com a manutenção da atividade da
25 proteína.

É importante acrescentar que o título da atividade antagonista e a concentração proteica do extrato C75 aumentaram consideravelmente em relação ao nosso estudo prévio. Na primeira análise, os valores foram 6400 UA/mL e 10 mg/mL, respectivamente. No presente estudo, observamos um título de atividade
30 antagonista de 819.200 UA/mL e uma concentração proteica de 37 mg/mL. Desta forma, a atividade antagonista do extrato aumentou cerca de 128 vezes, enquanto que a concentração de proteína, quase 4 vezes. Tal fato pode ser explicado pela modificação inserida no protocolo de extração proteica, que consistiu em cultivo

da amostra produtora sob agitação. Nesta condição, promove-se maior aeração e maior contato entre as células bacterianas e os nutrientes presentes no meio de cultura. Ambos os fatores favorecem a multiplicação celular e, indiretamente, uma maior produção de bacteriocinas. O efeito deve-se não ao estímulo à síntese da substância, mas, sim, à obtenção de maior massa celular. Fenômeno bastante diferente que pode levar a resultado final semelhante é o aumento real da produção de bacteriocinas em condições de estresse, já bem documentado na literatura (RILEY & WERTZ, 2002; RILEY, 2009).

Ao avaliarmos o espectro de atividade de SsP e de seus extratos proteicos, foi possível observar expressão de antagonismo apenas contra enterobactérias, ou seja, amostras filogeneticamente relacionadas à amostra produtora. A frequência de amostras sensíveis foi bastante variável entre os grupos, detectando-se valores mais elevados naqueles com maior grau de parentesco (*S. sonnei*: 76,5 % e *S. flexneri*: 55,0 % comparados com *E. coli*: 24,1% e *Enterobacter* spp.: 5,9 %).

O espectro de ação do antagonismo expresso pela amostra de *S. sonnei* em estudo está de acordo com a definição clássica de bacteriocinas, substâncias ativas, principalmente, contra bactérias taxonomicamente relacionadas à amostra produtora (REEVES, 1965). Assim, colicinas parecem desempenhar papel importante na competição por *habitat*, nicho e recursos. Organismos próximos do ponto de vista filogenético são, também, fisiologicamente similares. E a competição tende a ser mais acirrada entre estes organismos, que apresentam requerimentos nutricionais e ambientais, bem como características e comportamentos semelhantes. Se colicinas atuam, especialmente, sobre organismos próximos, a habilidade de síntese destas substâncias confere vantagem competitiva exatamente contra seus principais competidores.

Deve-se destacar, ainda, que, a presença de grupos bacterianos variados é crítica para a saúde de cada sítio e, em última análise, do hospedeiro como um todo. Também para os microrganismos, a diversidade é fundamental. Uma vez que as colicinas vêm persistindo por milhares de anos, deve-se admitir, numa análise global, que o benefício de sua produção supera seus efeitos indesejáveis. No que se refere às bactérias, a repercussão da síntese destas substâncias é ainda mais relevante, visto que a biossíntese de colicinas é um processo letal.

Aparentemente, seu papel no controle das relações interbacterianas e na homeostase do hospedeiro justifica o fato desta propriedade ser tão disseminada entre as bactérias (CHAVAN & RILEY, 2007).

5 Nossos dados sugerem que a produção de colinas por amostras de *S. sonnei* possa representar uma habilidade de virulência importante, tanto antes como durante a infecção. No período que antecede a infecção, a amostra de *S. sonnei* produtora apresentaria vantagem competitiva contra outras amostras enteropatogênicas, sensíveis à colicina produzida. Em um ambiente precário em termos de higiene e saneamento básico, em que é considerável a presença de
10 vários agentes etiológicos de enterite bacteriana aguda, a elaboração de colicinas pode ser considerada uma vantagem importante para a linhagem produtora. Entre os enteropatógenos testados, observou-se atividade apenas contra *S. sonnei* e *S. flexneri*. De qualquer maneira, é possível que amostras capazes de expressar colicinas sejam mais bem sucedidas competitivamente e, por esta razão, tenham
15 mais chances de sucesso no processo de infecção do hospedeiro.

Em estudo previamente realizado pelo nosso grupo (SOUSA *et al.*, 2010), que avaliou a expressão de atividade antagonista por 16 amostras de *S. sonnei* isoladas de espécimes fecais de crianças com enterite aguda contra amostras de referência de bactérias diarreiogênicas, resultados diferentes foram obtidos. Em
20 adição a *S. sonnei* e *S. flexneri*, observou-se atividade também contra os patotipos diarreiogênicos EHEC, EPEC e EIEC.

Por outro lado, durante a infecção, a síntese de colicinas poderia facilitar a competição contra a microbiota indígena. A produção destas substâncias antagonistas poderia contribuir para a ocupação de um *habitat*/nicho previamente
25 ocupados por uma bactéria da microbiota intestinal filogeneticamente relacionada, como *E. coli* ou *Enterobacter*, por exemplo, facilitando, assim, o estabelecimento do microrganismo. Considerando a baixíssima dose infectante de *Shigella* (SUR *et al.*, 2004; NIYOGI, 2005; SCHROEDER & HILBI, 2008), não seria um exagero supor que a produção de colicinas desempenharia papel relevante no processo
30 de infecção pelo microrganismo. Estas proteínas poderiam contribuir para a eliminação de bactérias anaeróbias facultativas da microbiota intestinal suscetíveis à sua ação, presentes, principalmente, na superfície do epitélio intestinal, facilitando o processo de invasão (PADILLA *et al.*, 2004). Bactérias

anaeróbias facultativas, como as enterobactérias, estariam, predominantemente, nestas regiões mais superficiais e, portanto, expostas a uma maior oxigenação.

Foi possível verificar expressão de antagonismo pela amostra de *S. sonnei* contra membros importantes da microbiota intestinal dominante de seres humanos (dados não mostrados), embora os resultados não tenham sido reprodutíveis. Esta seria uma habilidade muito interessante para *Shigella*, considerando a importância da barreira biológica que a microbiota intestinal desempenha, fundamental para a manutenção da saúde do hospedeiro. A relevância do efeito barreira da microbiota é especialmente nítido no intestino grosso, sítio densamente colonizado e órgão alvo de *S. sonnei* (TAPPENDEN & DEUTSCH, 2007; BIK, 2009; LESER & MOLBAK, 2009). Seria oportuno o emprego de um número maior de amostras de representantes da microbiota intestinal dominante de seres humanos para a obtenção de resultados mais consistentes.

Mais uma vez, os dados relatados por Sousa e colaboradores (2010) diferem daqueles obtidos nesta investigação. Nenhuma das nove amostras de *S. sonnei* que expressaram antagonismo foi capaz de inibir as amostras de referência de bactérias indígenas membros da microbiota intestinal dominante empregadas no estudo. Por outro lado, Padilla e colaboradores (2004) demonstram que amostras de *S. flexneri* produziam bacteriocinas ativas contra membros da microbiota intestinal de seres humanos. Os autores empregaram 40 amostras de *E. coli* e 40 amostras de *B. fragilis* isoladas de indivíduos saudáveis.

A avaliação da atividade citotóxica da bacteriocina contra linhagens celulares de seres humanos, bem como a condução de testes de desempenho da substância em condições *in vivo* são extremamente necessárias para o entendimento do papel das bacteriocinas, inclusive como fator de virulência. Entretanto, para que isto seja possível, é fundamental a purificação e a caracterização da substância. Extratos proteicos celulares contêm inúmeras substâncias diferentes e não seria possível atribuir um determinado efeito à atividade de uma proteína específica e não a qualquer outra molécula presente na amostra. Certamente, conclusões fidedignas só poderão ser obtidas pelo emprego de proteínas altamente purificadas

Ao avaliar o espectro de ação da amostra SsP, foi possível observar a

formação de halos de inibição de tamanhos diferentes, dependendo da amostra reveladora empregada. Esta variação sugere a elaboração de mais de uma substância antagonista, com perfis de atividade diferentes. Assim, pode-se hipotetizar que a amostra produtora seja capaz de secretar bacteriocinas com capacidades de difusão diferentes. Halos com diâmetros maiores seriam atribuídos à expressão fenotípica de uma bacteriocina com facilidade de difusão no ágar, uma molécula pequena ou apolar, por exemplo. Uma outra reveladora, resistente à esta bacteriocina de fácil difusão, poderia ser sensível à ação de uma outra bacteriocina, com baixa difusão, que originaria um halo de inibição menor. Alternativamente, é plausível supor que as amostras reveladoras apresentem níveis diferentes de suscetibilidade à substância antagonista. Assim, halos de diâmetros variáveis seriam gerados, de forma semelhante ao que se observa em antibiogramas clássicos.

Padilla e colaboradores (2004) também demonstraram variação no tamanho dos halos de inibição, mas, diferentemente do nosso estudo, o resultado foi observado para uma mesma amostra reveladora. No relato dos pesquisadores, os halos com diâmetros diversos foram produzidos por diferentes colônias da amostra de *S. flexneri*. A explicação proposta foi a maior ou menor produção de bacteriocina. Os dados relativos a heterogeneidade populacional do nosso estudo diferem daqueles relatados por Padilla e colaboradores (2004). Todos os 100 clones da amostra produtora testados exibiram atividade e originaram halos de inibição da amostra reveladora com diâmetros similares. No que se refere à amostra de *S. sonnei* Ssp, a característica *expressão de antagonismo* apresenta-se distribuída de forma homogênea na população.

Consideramos que a amostra de *S. sonnei* que foi sensível à ação dos extratos proteicos, mas não à amostra produtora de bacteriocina, merece ser melhor estudada. Provavelmente, a extração de proteínas por sulfato de amônio permitiu concentrar a bacteriocina que era secretada em níveis baixos. É possível, ainda, que as condições de cultivo *in vitro* não tenham favorecido a exportação da bacteriocina ou que, por alguma razão, a proteína antagonista não seja secretada pela bactéria.

Considerando tudo o que foi abordado até o momento sobre a expressão fenotípica de antagonismo por *S. sonnei*, podemos considerar que a avaliação do

tamanho dos halos de inibição não deve ser utilizada como critério para seleção de uma amostra para emprego em etapas subsequentes de estudos envolvendo a purificação e a caracterização de bacteriocinas. Nesta investigação, observamos que uma mesma amostra era capaz de produzir halos de tamanhos diferentes ou, até mesmo, não produzir halos, na dependência da amostra reveladora. Assim, a escolha da bactéria produtora a ser estudada deve levar em consideração outros critérios.

Os antimicrobianos, em geral, podem ser classificados como agentes bacteriostáticos ou bactericidas. Agentes bacteriostáticos inibem a multiplicação celular, mas não matam as células suscetíveis. Agentes bactericidas, por outro lado, causam a morte das bactérias. Entretanto, estas categorias não são absolutas, já que o efeito dos antimicrobianos é influenciado por uma série de fatores, como, método de estudo e amostra bacteriana testada. Alguns agentes podem ser bactericidas contra um determinado grupo de microrganismos e bacteriostático contra outro. A concentração do antimicrobiano utilizado também deve ser considerada. A atividade bactericida de um agente contra um determinado microrganismo relaciona-se ao seu mecanismo de ação. Em geral, agentes que provocam danos à parede, à membrana celular ou às enzimas bacterianas essenciais são bactericidas. Por outro lado, agentes que inibem a função ribossomal e a síntese de proteínas tendem a ser bacteriostáticos (FRENCH, 2006).

A CIM é a definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir a multiplicação visível do microrganismo (LEVISON 2000; FRENCH, 2006). CBM, por sua vez, é definida como a menor concentração da substância antimicrobiana capaz de reduzir a contagem de células viáveis em 99,9% (LEVISON, 2000; FRENCH, 2006; VALEFF, 2011). Um antimicrobiano é considerado bactericida quando a CBM não é mais do que quatro vezes o valor da MIC (FRENCH, 2006).

A substância antagonista presente em C75 apresentou valores de CIM e CBM equivalentes. Adicionalmente, observou-se que as células viáveis da bactéria reveladora foram eliminadas em um pequeno intervalo de tempo. Os achados demonstram atividade bactericida de C75. É importante ressaltar que os testes foram realizados com o extrato proteico bruto, onde se encontram várias

outras proteínas e, possivelmente, até mesmo outras bacteriocinas. Assim, após a purificação da(s) bacteriocina(s) produzidas por *S. sonnei*, é necessária a repetição dos testes para determinação do modo de ação por meio da avaliação de CIM e CBM.

5 A purificação de proteínas e posterior caracterização são passos fundamentais para a compreensão dos processos nos quais as mesmas estão envolvidas (LOUREIRO, 1991). A otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação baseada em tentativa e erro, especialmente quando não se conhece as características físico-químicas da proteína a ser
10 purificada. Muitas vezes, durante o processo, as proteínas podem sofrer pequenas ou grandes mudanças estruturais, que geram perda da sua atividade biológica, dificultando, assim, a sua purificação. O fato das proteínas serem, em geral, macromoléculas muito frágeis e, conseqüentemente, facilmente degradadas em temperaturas elevadas e na presença de solventes orgânicos ou
15 fatores oxidantes, dentre outros, torna o processo de purificação muito laborioso. Não raro, são requeridos anos para o estabelecimento de um protocolo bem elaborado, que considere rapidez, custo, rendimento e grau de pureza da proteína desejada (ALMEIDA & KURTENBACH, 2002).

Nesta investigação, com o objetivo de purificar a(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela amostra em estudo, empregamos um protocolo que se baseia
20 na extração proteica por precipitação com sulfato de amônio, seguida por etapas sequenciais de cromatografia, a saber, troca iônica, exclusão molecular e fase reversa. Nossa escolha baseou-se na experiência acumulada pelo grupo na condução de estudos desta natureza.

25 As proteínas existentes em uma solução apresentam variações de solubilidade em função da força iônica do solvente. Quando no solvente existem baixas concentrações de sais, a solubilidade das proteínas é grande. À medida que a concentração de sal (sulfato de amônio, por exemplo) aumenta, há uma diminuição na solubilidade das proteínas, que tendem a se precipitar. Os valores
30 de força iônica nos quais ocorre a precipitação variam de proteína para proteína, permitindo, assim, uma separação proteica nesta etapa. As proteínas precipitadas podem ser, posteriormente, solubilizadas, sem que haja grande risco de desnaturação (LOUREIRO, 1991).

Desta forma, a etapa de precipitação de proteínas extracelulares e intracelulares da amostra produtora já representa o início do processo de purificação da proteína alvo, no caso, a(s) bacteriocina(s). É possível (ou mesmo provável) que a atividade antagonista exibida pela fração C75 seja devida a moléculas diferentes daquelas presentes no extrato C30, por exemplo. Como já mencionado, o processo de purificação de proteínas é muito complexo. Por isso, foi selecionado apenas um dos extratos para o estudo. Optamos por aquele com maior título de atividade antagonista (C75), já que isto representa maior perspectiva de sucesso na etapa de purificação, o que não descarta a possibilidade e interesse na busca de outra(s) bacteriocina(s) eventualmente presentes nos demais extratos ativos.

As cromatografias são métodos físico-químicos de separação dos componentes de uma mistura, realizada pela distribuição dos mesmos em duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto que a outra se move por ela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migração diferencial destes componentes (COLLINS, 2010).

A primeira cromatografia utilizada no protocolo de purificação empregado neste trabalho foi a cromatografia por troca iônica. Nesta, a fase estacionária é altamente carregada e solutos com carga oposta são seletivamente adsorvidos a partir da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser, subsequentemente, eluídos por deslocamento por outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (SPADARO, 2010).

A coluna selecionada para os experimentos de cromatografia de troca iônica é constituída de uma matriz à qual está ligado o grupo funcional $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Desta forma, trabalhamos com um meio permutador aniônico, que estabelece ligações iônicas com moléculas carregadas negativamente. Assim, o pico A, representado pelas frações 1 a 5, corresponde a proteínas neutras ou carregadas positivamente, que não se ligaram à coluna (ou seja, foram coletados antes do início do gradiente de NaCl). Os picos B (frações 13 e 14) e C (frações 15 e 16), por sua vez, apresentam moléculas carregadas negativamente, visto que as mesmas se ligaram à coluna (FIG 10). Todas as frações obtidas nesta

etapa cromatográfica apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora, em maior ou menor grau. Tal fato é um indício da produção de várias moléculas com atividade antagonista.

5 A utilização de cromatografia por exclusão molecular foi o próximo passo no processo de purificação da(s) bacteriocina(s). Este método, também chamado de cromatografia por gel filtração, promove uma distribuição seletiva das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanhos determinados (ROTHSCHILD, 2010). Se uma amostra (fase móvel), composta por moléculas de várias
10 dimensões, for aplicada a uma coluna com gel (fase estacionária) composta por partículas com poros de determinado diâmetro, as moléculas da amostra serão eluídas da coluna em ordem decrescente de suas dimensões. Isto porque as moléculas maiores não penetram nas porosidades das partículas do gel e, conseqüentemente, a sua migração ao longo da coluna não é retardada. Por
15 outro lado, moléculas pequenas, ao penetrarem nos poros do gel, distribuem-se por um volume líquido maior e, por este motivo, o deslocamento pela coluna é retardado (LOUREIRO, 1991).

Várias frações obtidas a partir desta cromatografia, mas não todas, também apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora. Os
20 picos ativos encontravam-se na primeira metade das frações coletadas, indicando a presença de bacteriocinas com tamanhos médios ou grandes.

A última etapa do processo de purificação da(s) bacteriocina(s) foi a utilização da cromatografia de fase reversa. Nesta, as proteínas e peptídeos são separados de acordo com suas diferenças de hidrofobicidade. Devido à natureza
25 da matriz, as ligações são, geralmente, muito fortes, requerendo o uso de solventes orgânicos para a eluição (JARDIM *et al.*, 2010).

Para cada pico da cromatografia por exclusão molecular que era submetido à cromatografia de fase reversa, verificamos, novamente, a presença de várias frações (divididas entre vários picos) com atividade antagonista. Tal fato
30 indica, novamente, a presença de mais de uma bacteriocina responsável pela atividade antagonista de C75 ou, alternativamente, uma forte interação entre a(s) bacteriocina(s) e a matriz da coluna utilizada. A opção pela *recromatografia* de algumas frações se deu pelo fato de que, em uma análise inicial, verificou-se que

uma única passagem pela cromatografia de fase reversa não era sempre suficiente para a purificação da bacteriocina (dados não apresentados).

A utilização de SDS-PAGE do extrato bruto C75 seguida por revelação *in situ* de atividade antagonista permitiu a estimativa da massa molecular da(s) bacteriocina(s) produzida(s) por *S. sonnei*. Foi possível observar linhas de inibição da amostra reveladora correspondentes a proteínas com massas moleculares intermediárias (aproximadamente 57 e 66 kDa), o que corrobora os resultados obtidos na cromatografia por exclusão molecular. Mesmo sendo demonstrada a presença de apenas duas bandas proteicas ativas, não está descartada a produção de mais de duas substâncias antagonistas. A ausência de mais linhas de inibição da amostra reveladora pode estar relacionada à baixa produção de outras bacteriocinas pela amostra produtora, pelas alterações que a técnica de SDS-PAGE pode provocar na atividade biológica das proteínas ou pela baixa sensibilidade do método.

O resultado de SDS-PAGE para as frações originadas da cromatografia por troca iônica selecionadas para as etapas subsequentes de purificação mostra que o pico A (frações 1 a 5) e B (frações 13 e 14), embora representantes de moléculas com cargas diferentes, apresentam linhas de inibição com as mesmas massas moleculares observadas para o extrato C75. Tal fato pode ser explicado pela presença de bacteriocinas com pequenas diferenças de carga, devido a alterações em alguns aminoácidos (proteínas isoformas). O pico C (frações 15 e 16), por sua vez, apresentam somente a linha de inibição correspondente à massa molecular de 66 kDa. Assim, foi realizado novo experimento de SDS-PAGE, empregando as frações correspondentes ao pico C e as frações com atividade antagonista obtidas da corrida cromatográfica por exclusão molecular que utilizou este pico. Apenas o pico C.4, correspondente à fração 10, gerou banda com atividade antagonista, com massa molecular de 66 kDa.

Assim, o pico C.4 (fração 10) foi o único originado a partir da cromatografia por exclusão molecular que demonstrou atividade no teste de revelação *in situ* e apresentou concentração proteica muito baixa e título de atividade antagonista mais elevado. Estes dados, em conjunto, nos levaram a crer que a bacteriocina presente nesta fração poderia ser mais facilmente purificada. Foi necessária apenas uma etapa de cromatografia de fase reversa para finalizar

a purificação aparente da bacteriocina. No cromatograma correspondente a esta corrida (FIG. 20) observa-se um pico bem definido, que representa a substância ativa (fração C4). Quando encaminhado para espectrometria de massa, detectou-se a presença de apenas uma molécula, com massa molecular de 18,6 kDa. Além da massa ser muito diferente daquela encontrada em SDS-PAGE, ela também é

5 muito semelhante à de uma colicina purificada a partir de uma outra amostra de *S. sonnei* estudada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (SOUSA, 2010).

As outras amostras encaminhadas para espectrometria de massa (FIG. 24 e 25) apresentaram, inicialmente, moléculas com massas moleculares de

10 34,18 e 38,88 kDa [amostra (a)], 34,46 e 24,69 kDa [amostra (b)] e 22,44 kDa [amostras (c) e (d)]. Este resultado sugere que as moléculas mencionadas poderiam ser tripla ou dupla carga daquelas detectadas por SDS-PAGE. Entretanto, para confirmação desta hipótese, análises complementares precisariam ser realizadas.

Desta forma, uma segunda análise por espectrometria de massa, que permite a avaliação de moléculas com massa molecular entre 4 e 100 kDa foi realizada para as amostras (a), (b) e (c+d). Ao contrário do esperado, não foi possível verificar a presença de proteínas com massas moleculares equivalentes às detectadas por SDS-PAGE. É possível supor, então, que as proteínas

15 detectadas no gel encontram-se em alguma outra fração ativa, cuja análise não foi prosseguida. Alternativamente, fragmentos das proteínas com massa molecular de 57 ou 66 kDa responsáveis pela atividade antibacteriana estariam na amostra.

20

As sequências de peptídeos originadas da análise da amostra (a) não apresentavam similaridade significativa com nenhuma das 177 bacteriocinas (apenas 18 produzidas por bactérias Gram negativas) depositadas no banco de dados BACTIBASE. Entretanto, comparações empregando o BLAST revelaram similaridade com cinco proteínas diferentes. Quatro das proteínas identificadas são enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos: frutose bisfosfato

25 aldolase classe II, que catalisa a reação $D\text{-frutose } 1,6\text{-bisfosfato} \leftrightarrow \text{gliceronato } 1,3\text{-bisfosfato} + D\text{-gliceraldeído } 3\text{-fosfato}$; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, responsável pela catálise da conversão do gliceraldeído 3-fosfato em D-glicerato 1,3-bisfosfato; formato acetiltransferase 1, que catalisa a reação $\text{acetil-CoA} +$

30

formato \leftrightarrow CoA + piruvato; e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, que age na biossíntese de carboidratos, catalisando a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato e dióxido de carbono. Por último, a enzima cisteína sintetase A, que atua na biossíntese de aminoácidos, especificamente cisteína, catalisando a
5 reação $O(3)\text{-acetil-L-serina} + H_2S \rightarrow L\text{-cisteína} + \text{acetato}$ (UniProtKB; www.uniprot.org).

Assim como observado para a amostra (a), nenhum fragmento detectado na amostra (b) apresentou sequência similar a de bacteriocinas depositadas no banco de dados BACTIBASE. Quando pesquisado no BLAST, foi possível
10 verificar similaridade com oito proteínas diferentes, sendo que seis apresentavam mais de um fragmento correspondente. Dentre estas, cinco também estavam presentes na amostra (a), a saber: frutose bisfosfato aldolase classe II, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, formato acetiltransferase 1, cisteína sintetase A e fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Além destas, identificou-se a
15 proteína seril-tRNA sintetase, que catalisa a ligação do aminoácido serina ao seu RNAt.

De forma semelhante, a amostra (c+d) também não apresentou fragmentos proteicos que exibiram similaridade significativa com bacteriocinas presentes no banco de dados BACTIBASE. A busca no BLAST, entretanto,
20 resultou na detecção de similaridade com várias proteínas, sendo que apenas 10 apresentaram mais de um fragmento correspondente. Destas, a frutose bisfosfato aldolase classe II e a cisteína sintetase A já haviam sido detectadas na amostra (a).

A amostra (c+d) também apresentou fragmentos correspondentes a
25 glicose-1 fosfato, outra enzima que participa do metabolismo de carboidratos, catalisando a reação $\text{alfa-D-glicose 1-fosfato} + H_2O \leftrightarrow D\text{-glicose} + \text{fosfato}$, e fragmentos correspondentes à S-ribosil-homocisteína liase, que apresenta atividade catalítica na síntese do autoindutor AI-2, que está envolvido em processos de *quorum sensing* (UniProtKB). Embora os dados sejam muito
30 preliminares para embasar qualquer discussão mais definitiva, a relação com *quorum sensing* descrita para esta enzima, também já foi relatada para bacteriocinas.

Merece destaque ainda o fato de que cinco fragmentos detectados

apresentaram similaridade com *proteínas hipotéticas* de *Shigella*, ou seja, proteínas cujas sequências foram inferidas pelo genoma do microrganismo, mas, que não apresentam função conhecida. Estas proteínas podem ser bacteriocinas ainda não descritas, responsáveis pela atividade antagonista apresentada pela amostra. Entretanto, um estudo mais aprofundado deve ser realizado para avaliar esta hipótese.

A presença de peptídeos correspondentes a tantas proteínas na amostra (c+d) pode ser explicada pela mistura das amostras (c) e (d) antes da tripsinólise. Tal fato não era esperado, uma vez que os resultados do primeiro ensaio de espectrometria de massa realizado com as amostras isoladas sugeriram a presença de apenas uma molécula em cada, com massas moleculares idênticas. Esta foi a razão para que as amostras fossem combinadas, como já mencionado anteriormente. Entretanto, a técnica de espectrometria empregada nesta primeira análise mostrou-se inadequada para a detecção de proteínas grandes. A segunda análise, por outro lado, própria para análise de proteínas com massa molecular na faixa de 4 a 100 kDa, revelou a presença de várias moléculas em cada uma das amostras testadas. A amostra (c+d), inclusive, foi a que apresentou o maior número de moléculas.

É importante salientar que todas as amostras, (a), (b) e (c+d), apresentaram vários íons com a mesma massa molecular que não puderam ser sequenciados. É possível que eles representem as mesmas proteínas. Vale enfatizar, ainda, que a observação das mesmas proteínas nas diferentes frações parcialmente purificadas ativas pode representar um indício de que elas poderiam ser as responsáveis pela atividade antagonista.

Deve ser destacado que, embora os peptídeos obtidos apresentem similaridade com mais de uma proteína por amostra, eles são, realmente, fragmentos tripsínicos de proteínas bacterianas. Isto significa que a tripsinólise funcionou bem, não gerando fragmentos de autólise ou contaminantes de manipulação, como, por exemplo, queratina.

A purificação completa de uma proteína é fundamental para atribuir a ela uma função específica. Sendo assim, ainda não podemos afirmar com clareza qual(is) proteína(s) é(são) responsável(eis) pela atividade antagonista apresentada pelo extrato C75, embora este tenha sido submetido a cinco etapas

cromatográficas para a obtenção dos resultados apresentados neste trabalho. Não foi encontrada na literatura disponível a descrição de atividade antibacteriana para nenhuma das proteínas detectadas. Sabe-se, entretanto, que uma mesma enzima pode exibir múltiplas funções. A gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, por exemplo, além de sua função metabólica, está envolvida no transporte de vesículas, na sinalização celular mediada por receptores, na manutenção da integridade do DNA, na resposta ao estresse oxidativo e na apoptose, dentre outras funções (SIROVER, 2011). Assim, é perfeitamente plausível que quaisquer das proteínas detectadas atue como bacteriocina em adição à atividade já descrita para as mesmas.

As colicinas do grupo E (colicinas E2 a E9) apresentam massa molecular em torno de 60 kDa e apresentam atividade de nuclease (CASCALES *et al.*, 2007). Em estudo anterior (SOUSA, 2010), nosso grupo de pesquisa detectou genes que codificam as colicinas E1, E2, E3, E4 e E7 no material genético da amostra produtora empregada neste estudo. Assim, embora os dados dos estudos sejam, ainda, preliminares, eles parecem ser concordantes. Então, a inibição detectada pelo teste de revelação *in situ* após SDS-PAGE, correspondente a bandas proteicas com massas moleculares na faixa de 57-66 kDa, poderiam se dever à expressão deste grupo de colicinas.

20

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 5 • A amostra de *S. sonnei* produtora de substância antagonista empregada neste estudo é capaz de elaborar, pelo menos, duas bacteriocinas diferentes. Tal fato pode ser comprovado pela detecção de diversas frações ativas após as etapas de cromatografia, pela variedade de halos produzidos contra diferentes amostras indicadoras e, especialmente, pela
- 10 presença de bandas proteicas ativas com massas moleculares distintas, demonstrada por SDS-PAGE/revelação *in situ*.
- O protocolo de extração empregando cultivo da amostra produtora de substância antagonista sob agitação permitiu a obtenção de título de atividade antagonista mais elevado, possivelmente, em decorrência da
- 15 maior densidade populacional.
- *S. sonnei* apresentou atividade antagonista apenas contra amostras filogeneticamente relacionadas, o que está de acordo com a definição clássica de bacteriocina e reforça a hipótese de que a substância desempenha papel relevante na virulência da bactéria. Tanto amostras da
- 20 microbiota intestinal indígena como agentes diarreio gênicos mostraram-se suscetíveis à ação da amostra produtora. Assim, o espectro de atividade da bactéria sugere a possibilidade de atuação da(s) bacteriocina(s) tanto antes como durante a shigelose.
- A expressão de antagonismo é uma característica distribuída de maneira
- 25 homogênea na população da amostra produtora.
- O extrato C75 apresenta o mesmo valor de CIM e CBM, o que demonstra atividade bactericida contra a amostra de *S. sonnei* empregada como reveladora. O resultado deve ser confirmado após a purificação completa da(s) bacteriocina(s) presente(s) na fração.
- 30 • As massas moleculares de duas substâncias ativas de natureza proteica foram estimadas por SDS-PAGE em 57 e 66 kDa. Entretanto, apenas a

purificação parcial das proteínas foi obtida após as etapas sequenciais de cromatografia, como revelado pela espectrometria de massa.

- 5 • Os fragmentos proteicos das amostras contendo a(s) bacteriocina(s) parcialmente purificada(s) apresentaram identidade com enzimas do metabolismo de carboidratos, síntese de aminoácidos e processo de *quorum sensing*, dentre outros. Nenhum deles apresentou semelhança significativa com sequências de bacteriocinas já descritas depositadas em bancos de dados.
- 10 • Fragmentos proteicos que apresentaram similaridade com proteínas com função desconhecida também foram detectados. É possível que estas sejam bacteriocinas ainda não identificadas e, assim, responsáveis pela atividade antagonista expressa por *S. sonnei*. Para investigação desta hipótese, estudos complementares são fundamentais.
- 15 • O protocolo de purificação empregado não foi eficaz para a purificação das bacteriocinas presentes no extrato C75. É importante que o mesmo seja otimizado, para que, após obtenção da(s) proteína(s) ativa(s) purificada(s), ela(s) possam ser melhor caracterizadas. Estes dados poderão contribuir para o conhecimento relativo à expressão de antagonismo por *S. sonnei*.
- 20 • A relevância de *S. sonnei*, agente de uma forma de enterite aguda grave e prevalente, a importância básica e aplicada das bacteriocinas, inclusive como habilidade de virulência bacteriana, e a escassez de dados relativos ao tema, justificam a realização deste tipo de estudo. Consideramos que o projeto gerou dados muito significativos e, adicionalmente, apontou para
25 diversas outras possibilidades a serem, então, investigadas. Diversas perguntas foram respondidas e muitas outras foram feitas a partir dos resultados obtidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 ALMEIDA, M. S.; KURTNBACH, E. Como purificar proteínas? O exemplo das defensinas antifúngicas de ervilha. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 24, p. 30-35, 2002.
- AMAKO, K.; MATSUGUSHI, M.; TAKEYA, K.; TATSUTA, E.; TAKAGI, Y. Purification and the ultrastructure of a bacteriocin produced from *Shigella sonnei* strain 100052. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 14, p. 488-492, 1978.
- 10 APOLÔNIO, A. C. M.; CARVALHO, M. A. R.; RIBAS, R. N. R.; SOUSA-GAIA, L. G.; SANTOS, K. V.; LANA, M. A.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M. Production of antagonistic substance by *Eikenella corrodens* isolated from the oral cavity of human beings with and without periodontal disease. *J Appl Microbiol*, v. 103, p. 245-251, 2007.
- 15 APOLÔNIO, A. C.; CARVALHO, M. A. R.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; PINTO, S. Q.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, K. V.; FARIAS, L. M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *J Appl Microbiol*, v. 104, p. 508-514, 2008.
- 20 AVELAR, K. E. S.; PINTO, J. F.; ANTUNES, L. C. M.; LOBO, L. A.; BASTOS, M. C. F.; DOMINGUES, R.M.C.P.; FERREIRA, M.C. Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. *Lett Appl Microbiol*, v. 29, p. 264-268, 1999.
- AZPIROZ, M. F.; POEY, M. E.; LAVIÑA, M. Microcins and urovirulence in
25 *Escherichia coli*. *Microb Pathog*, v. 47, p. 274-280, 2009.
- BAQUERO, F.; MORENO, F. The *Microcins*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 23, p. 117-124, 1984.
- BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; METRO, F.; PRÉVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T. Purification and
30 characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J Appl Microbiol*, v. 101, p. 837-848, 2006.

- BERGAN, J.; LINGELEM, A. B. D.; SIMM, R.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Shiga toxins. *Toxicon*, v. 60, p. 1085-1107, 2012.
- BHATTACHARYA, S. K; SUR, D. An evaluation of current shigellosis treatment. *Expert Opin Pharmacother*, v. 4, p. 1315-1320, 2003.
- 5 BIK, E. M. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutrition Rev*, v. 67, p. S164-S171, 2009.
- BLASER, M. J.; FALKOW, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Rev*, v. 7, p. 887-894, 2009.
- BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L; WILKINS, T. D. Bacteriocin production by strains
10 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. 718-24, 1977.
- 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.
15 7, p. 248-254, 1976.
- BRAUN, V.; PILSL, H.; GROB, P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch Microbiol*, v. 161, p. 199-206. 1994.
- BRAUN, V.; PATZER, S. I.; HANTKE, K. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, v. 84, p. 365-380, 2002.
- 20 BUDIC, M.; RIJAVEC, M.; PETKOVSEK, Z.; ZQUR-BERTOK, D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS One*, v. 6, e28769, 2011.
- CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBE, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin Biology. *Microbiol
25 Mol Biol Rev*, v. 71, p. 158-229, 2007.
- CASTILLO, F. J.; CARRANZA, E.; CLAVEL, A.; RUBIO, M. C.; GÓMEZ-LUS, R. Epidemiology of shigellosis and colicin typing of *Shigella sonnei*. A 14-year study. *Enferm. Infec Microbiol Clin*, v. 9, p. 530-536, 1991.
- CHAN-TEOH, C. H.; WONG, W. T.; HUANG, C. T.; SHUM, H. Colicine types of
30 *Shigella sonnei* isolated in Hong Kong. *J Clin Pathol*, v. 24, p. 636-640, 1971.

- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Gent Evol*, v. 12, p. 214-226, 2012.
- CHAVAN, M. A.; RILEY, M. Molecular evolution of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology an*
5 *Evolution*. Springer, 2007. p. 19-43.
- CHUNG, H.; KASPER, D. L. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol*, v. 22, p. 455-460, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *M100-S21: Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; The Twenty-First Informational Supplement*. v.
10 31, 2011. 165 p.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2010. p. 17-45.
- COLLINS, S. M.; SURETTE, M.; BERCIK, P. The interplay between the intestinal
15 microbiota and the brain. *Nature*, v. 10, p. 735-742, 2012.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, v. 3, p. 777-788, 2005.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*, v. 11, p. 95-105, 2013.
- 20 CORR, S. C; GAHAN, C. C. G. M.; HILL, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 52, p. 2-12, 2008.
- COX, C. R.; COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic
25 and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*, v. 6, p. 77-84, 2005.
- CURSINO, L.; ŠMARDA, J.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Braz J Microbiol*, v. 33, p.185-195, 2002.
- DATTA, V.; MYSKOWSKI, S. M.; KWINN, L. A.; CHIEM, D. N.; VARKI, N.;
30 KANSAL, R. G.; KOTB, M.; NIZET, V. Mutational analysis of the group A

streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. *Mol Microbiol*, v. 56, p. 681-695, 2005.

DAW, M. A.; FALKINER, F. R. Bacteriocins: nature, function and structure. *Microm*, v. 27, p. 467-479, 1996.

- 5 DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUSSI, J.; REBUFFAT, S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, v. 84, p. 551-519, 2002.

10 DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, v. 449, p. 811-818, 2007.

DiBAISE, J. K; ZHANG, H.; CROWELL, M. D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G. A. ; RITTMANN, B. E. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*, v. 83, p. 460-469, 2008.

15 DOBSON, A.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*, v. 78, p. 1-6, 2011.

DUFOUR, A.; HINDRE, T.; HARAS, D.; LE PENNEC, J. P. The biology of lantibiotics from the lacticin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol Rev*, v. 31, p. 134-167, 2007.

20 DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZON, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*, v. 24, p. 708-734, 2007a.

DUQUESNE, S.; PETIT, V.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from Enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, v. 13, p. 200-209, 2007b.

25 ELPEK, G.; ICGEN, B.; OZCENGIZ, G. Colicinogeny in local isolates of salmonellae and plasmid transfer studies. *Folia Microbiol (Praha)*, v. 48, p. 257-260, 2003.

30 FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M. S.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; TAVARES, C. A. P.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Extracion, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin)

- produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. *Res Microbiol*, v. 145, p. 9-16, 1994.
- FEIL, E. J. The emergence and spread of dysentery. *Nat Genet*, v. 44, p. 964-965, 2012.
- 5 FLINT, H. J. The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutr Rev*, v. 70, p. S10-S13, 2012.
- FORSYTHE, P.; KUNZE, W. A.; BIENENSTROCK, J. On communication between gut microbes and the brain. *Curr Opin Gastroenterol*, v. 28, p. 557-562, 2012.
- FREDERICQ, P. Colicins. *Annu Rev Microbiol*, v. 11, p. 7-22, 1957.
- 10 FRENCH, G. L. Bacterial agents in the treatment of MRSA infections - the potential role of daptomycin. *J Antimicrob Chemother*, v. 58, p. 1107-1117, 2006.
- GALVIN, M.; HILL, C.; ROSS, R. P. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett Appl Microbiol*, v. 28, p. 355-358, 1999.
- 15 GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, v. 84, p. 577-592, 2002.
- GILLOR, O.; KIRKUP, B. C.; RILEY, M. A. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv Appl Microbiol*, v. 54, p. 129-146, 2004.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and
20 probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 81, p. 591-606, 2008.
- GORDON, D. M.; OLIVER, E.; LITTLEFIELD-WYER, J. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer, 2007. p. 5-18.
- GOVAN, J. R. In vivo significance of bacteriocins and bacteriocin receptors. *Scand J Dis Suppl*, v. 49, p. 31-37, 1986.
- 25 GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C R Seances Soc Biol Fil*, v. 93, p. 1040-1041, 1925.
- HATTORI, M.; TAYLOR, T. D. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Research*, v. 16, p. 1-12, 2009.

- HENG, N. C. K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. RILEY, M. A.; CHAVAN, M. (eds) *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer, Berlin, 2007, p. 45-92.
- HINS DILL, R. D.; GOEBEL, W. F. Colicine K. The transfer of type K colicinogeny to *Shigella sonnei*. *J Exp Med*, v. 123, p. 881-895, 1966.
- HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*, v. 1, p. 4-21, 2010.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, v. 336, p. 1268-1273, 2012.
- 10 JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, v. 59, p. 171-200, 1995.
- JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, A.; WOLLMAN, E. Definition of some terms relative to lysogeny. *Ann Inst Pasteur*, v. 84, p. 222-224, 1953.
- JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2010. p. 273-398.
- 15 JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev*, v. 28, p. 43-58, 2004.
- JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIZOLA, J. M.; NUEN-PALOP, C.; NARBAD, A.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; RODRÍQUEZ, J. M. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of health neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol.*, v. 51, p. 270-274, 2005.
- 20 JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIOZOLA, J. M.; XAUS, J.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍQUEZ, J. M. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*, v. 159, p. 187-193, 2008.
- 25 JOERGER, R. D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Sci*, v. 82, p. 640-647, 2003.
- KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res.*, v. 622, p. 58-69, 2007.

- KERCKHOFFS, A. P. M.; SAMSON, M.; VAN BERGE HENEGOUWEN, G. P.; AKKERMANS, L. M. A.; NIEUWENHUIJS, V. B.; VISSER, M. R. Sampling microbiota in the human gastrointestinal tract. In: OUWEHAND, C.; VAUGHAN, E. E. [Ed.]. *Gastrointestinal Microbiology*. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 25-50.
- 5
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, v.12, p.39-85, 1993.
- KRIKUP, B. C. Jr. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr Med Chem*, v.13, p. 3335-3350, 2006.
- 10
- KRISTJÁNSSON, M.; VINER, B.; MASLOW, J. N. Polymicrobial and recurrent bacteremia with *Shigella* in a patient with AIDS. *Scand J Infect Dis*, v. 26, p. 411-416, 1994.
- LANCASTER, L. E.; WINTERMEYER, W.; RODNINA, M. V. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Mol Dis*, v. 38, p.15-8, 2007.
- 15
- LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, v. 330, p. 1768-1773, 2010.
- LESER, T. D.; MOLBAK, L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ Microbiol*, v. 11, p. 2194-2206, 2009.
- 20
- LEVISON, M. E. Pharmacodynamics of antibacterial drugs. *Infect. Dis. Clin. North Am*, v. 14, p. 281-291, 2000.
- LINE, J. E.; SVETICH, E. A.; ERUSLANOV, B. V.; PERELYGIN, V. V.; MITSEVICH, E. V.; MITSEVICH, I. P.; LEVCHUK, V. P.; SVETICH, O. E.; SEAL, B. S.; SIRAGUSA, G. R.; STERN, N. J. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 1094-1100, 2008.
- 25
- LOUREIRO, J. R. Purificação de proteínas. In: SILVA, J. M.; SALDANHA, C. *Actas de bioquímica*. Editorial Office, Lisboa, 1991. v. 5, p. 97-109.

- MALES, B. M.; STOCKER, B. A. D. Colicins E4, E5 E6 and properties of bluB+ colicinogenic transconjugants. *J Gen Microbiol*, v. 128, p. 95-106, 1982.
- MANTOVANI, H. C.; CRUZ, A. M. O.; PAIVA, A. D. Bacteriocin activity and resistance in livestock pathogens. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex, 2011. p. 85-863.
- MARCHESI, J.; SHANAHAN, F. The normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis.*, v. 20, p.508-513, 2007.
- MARCHESI, J. R. Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut. *Adv Appl Microbiol*, v. 72, p. 43-62, 2010.
- MARTIN, N. I.; SPRULES, T.; CARPENTER, M. R.; COTTER, P. D., HILL, C.; ROSS, R. P.; VERDERAS, J. C. Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry*, v. 43, p. 3049-3056. 2004.
- MERINO, L. A.; HREŇUK, G. E.; ALONSO, J. M.; RONCONI, M. C. Value of antibiotype and bacteriocinotype for differentiating *Shigella* strains isolated in Argentina. *Bull Soc Pathol Exot.* v. 93, p. 307-310, 2000.
- MORRIS, G. K.; WELLS, J. G. Colicin typing of *Shigella sonnei*. *Appl Microbiol*, v. 27, p. 312-316, 1974.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: MOSBY, 2006. 963p.
- NAVANEETHAN, U.; GIANNELLA, R. A. Infectious colitis. *Curr Opin Gastroenterol.* v. 27, p. 66-71, 2011.
- NHIEU, G. T. V.; SANSONETTI, P.J. Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr Op Microbiol*, v. 2, p. 51-55, 1999.
- NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L. P.; COELHO, L. G. V. (Eds). *Gastroenterologia*, Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda, 2004. p. 1037-1047.

- NISHIE, M.; NAGAO, J-I.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of the diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*, v. 17, p. 1-16, 2012.
- NIYOGI, S. K. Shigellosis. *J Microbiol*, v. 43, p. 133-143, 2005.
- 5 NUNES, M. R.; MAGALHÃES, P. P.; PENNA, F. J.; NUNES, J. M.; MENDES, E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. *J Pediatr (Rio J)*, v. 88, p. 125-128, 2012.
- O’CONNOR, E. M.; SHAND, R. F. Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 28, p. 23-31. 2002.
- 10 O’HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO*, v. 7, p. 688–693, 2006.
- OLIVEIRA, A. A. P.; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R.; COSTA, J. E.; CARVALHO, M. A. R. Bacteriocin production by *Fusobacterium* isolates recovered from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and marmosets. *Res Microbiol*, v. 149, p. 585-594, 1998.
- 15 OLIVEIRA, P. L. *Caracterização parcial de substância(s) antagonista(s) produzida(s) por uma amostra de Shigella sonnei isolada de espécime fecal de criança com diarreia aguda*. 2010. 51f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- 20 OTTMAN, N.; SMIDT, H.; de VOS, W. M.; BELZER, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. v. 2, p. 1-11, 2012.
- 25 PADILLA, C.; LOBOS, O.; HUBERT, E. *Shigella flexneri* strains produce bacteriocins active against members of the human microbial intestinal flora. *Rev Latinoam Microbiol*, v. 46, p. 85-88, 2004.
- PAIZS, B.; SUHAI, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev*, v. 24, p. 508-548, 2005.

- PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, v. 5, p. 1556-1573, 2007.
- PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococcus*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, v. 8, 2009.
- PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett*, v. 252, p. 11-18, 2005.
- PASTEUR, L.; JOUBERT, J. F. Charbon et septicémie. *C R Soc Biol Paris*, v. 85, 10 p. 101-115, 1877.
- PEI, Z.; BINI, E. J.; YANG, L.; ZHOU, M.; FRANCOIS, F.; BLASER, M.J. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, p. 4250-4255, 2004.
- PENG, J. P.; YANG, J.; JIM, Q. Research progress in *Shigella* in the postgenomic era. *Sci China Life Sci*, v. 53, p. 1284-1290, 2010.
- PETTKER, C. M.; BUHIMSCHI, I. A.; MAGLOIRE, L. K.; SFAKIANAKI, A. K., HAMAR, B. D. BUHIMSCHI, C. S. Value of placental microbial evaluation in diagnosing intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol*, v. 109, p. 739-749, 2007.
- PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. Shigellosis: innate mechanisms of 20 inflammatory destruction of the intestinal epithelium, adaptive immune response, and vaccine development. *Crit Rev Immunol*, v. 23, p. 371-401, 2003.
- PHILPOTT, D. J.; EDGEWORTH, J. D.; SANSONETTI, P. J. The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 355, p. 575-586, 2000.
- 25 PIETERSE, R.; TODOROV, S. D. Bacteriocins - Exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Braz J Microbiol*, v. 41, p. 542-562, 2010.
- POSSEMIERS, S.; GROOTAERT, C.; VERMEIREN, J.; GROSS, G.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; DE WIELE, T. V. The intestinal environment in health and disease - recent insights on the potential of intestinal bacteria to 30 influence human health. *Curr Pharmaceutical Design*, v. 15, p. 2051-2065, 2009.

- PUGSLEY, A. P. The ins and outs of colicins. Part II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol. Sci*, v. 1, p. 203-205, 1984.
- RAM, P. K.; CRUMP, J. A.; GUPTA, S. K.; MILLER, M. A.; MINTZ, E. D. Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol. Infect*, v. 136, p. 577-603, 2008.
- REEVES, P. The bacteriocins. *Bacteriol Rev*, v. 29, p. 24-45, 1965.
- REIS, R.S.; HORN, F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog*, v. 2, p. 8, 2010.
- REUTER, G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol*, v. 2, p. 43-53, 2001.
- RIBEIRO-RIBAS, R. N.; CARVALHO, M. A. R.; VIEIRA, C. A.; APOLÔNIO, A. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; MENDES, E. N.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; FARIAS, L. M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum* isolate. *J Appl Microbiol*, v. 107, p. 699-705, 2009.
- RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocina evolution. *Annu Rev Genet*, v. 32, p. 255-278. 1998.
- RILEY, M. A., GORDON, D. M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol*, v. 7, p.129-133,1999.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, v. 84, p. 357-364, 2002.
- RILEY, M. A. *Bacteriocins, biology, ecology, and evolution*. Oxford: Elsevier. p. 32-45, 2009.
- ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M. J.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; NEYRINCK, A.

- M.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*, v. 104 (Suppl 2), p. S1-S63. 2010.
- ROSS, R. P.; MILLS, S.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. *Intern Dairy J*, v. 20, p. 269-276, 2010.
- ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2010. p. 139-166.
- ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature*, v. 9, p. 313-323. 2009.
- 10 SABIA, C.; de NIEDERHAUSERN, S.; GUERRIERI, E.; MESSI, P.; ANACARSO, I.; MANICARDI, G.; BONDI, M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J Appl Microbiol*, v. 104, p. 970-979, 2008.
- SATOKARI, R.; GRONROOS, T.; LITINEM, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.
- 15 *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol.*, v. 48, p. 8-12, 2009.
- SAULNIER, D. M.; KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr Pharmaceut Des*, v. 15, p. 1403-1414, 2009.
- 20 SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, v.166, p. 368-79, 1987.
- SCHOLTENS, P. A.; OOZEER, R.; MARTIN, R.; AMOR, K. B.; KNOL, J. The early settlers: intestinal micro-biology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*, v. 3, p.
- 25 425-447, 2012.
- SCHROEDER, G.N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*, v. 2, p.134-156, 2008.
- SCHWARTZ, S.; FRIEDBERG, I.; IVANOV, I. V.; DAVIDSON, L. A.; GOLDSBY, J.
- 30 S.; DAHL, D. B.; HERMAN, D.; WANG, M.; DONOVAN, S. M.; CHAPKIN, R. A

- metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biol*, v.13, R32, 2012.
- SEKIROV, I.; FINLAY, B.B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol*, v. 587 (Pt 17), p 4159-4167, 2009.
- 5 SEKIROV I.; RUSSELL S. L.; ANTUNES L. C.; FINLAY B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, v. 90, p. 859-904, 2010.
- SHAKOOR, S.; ZAIDI, A. K. M.; HASAN, R. Tropical bacterial gastrointestinal infections. *Infect Dis Clin North Am*, v. 26, p. 437-453, 2012.
- SHANAHAN, F. The colonic microbiota in health and disease. *Curr Opin*
10 *Gastroenterol*, v. 28, p. 1-6, 2012.
- SHAND, R.; PRICE, L.; O'CONNOR, E. M. Halocins: protein antibiotics from hypersaline environments. In: OREN, A. (Ed.). *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998. p. 295-306.
- SHAND, R. F.; LEYVA, K. Peptide and protein antibiotics from domain Archaea:
15 Halocins and Sulfolobocins. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer, 2007. p. 93-109
- SIROVER, M. A. On the functional diversity of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys Acta*, v. 1810, p. 741-751, 2011.
- 20 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.
- SMAJS, D.; PILSL, H.; BRAUN, V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J Bacteriol*, v. 179, p. 4919-4928, 1997.
- SMAJS, D.; WEINSTOCK, G. M. Genetic organization of plasmid ColJs, encoding
25 colicin Js activity, Immunity, and release genes. *J Bacteriol*, v. 183, p. 3949–3957, 2001.
- SMAJS, D.; MICENKOVÁ, L.; SMARDA, J.; VRBA, M.; SEVCIKOVÁ, A.; VALISOVÁ, Z.; WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC*
30 *Microbiol*, v. 10, p. 288, 2010.

- SMARDA, J.; PETRZELOVÁ, J.; VYSKOT, B. Colicin JS os *Shigella sonnei*: classificatin of type colicin “7”. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, v. 263, p. 530-540, 1987.
- SMARDA J.; SMAJS D. Colicins - exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*.
5 *Folia Microbiol (Praha)*, v. 43, p.563-582, 1998.
- SOUSA, M. A. B. *Atividade antagonista de Shigella*: pesquisa, extração, purificação e caracterização de uma nova bacteriocina. 2010. 111f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- 10 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, 2013.
- SOUSA, M. A. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIAS, L. M.;
15 MAGALHÃES, P. P. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhea. *APMIS*, v. 118, p. 125-135, 2010.
- SPADARO, A. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2010. p. 104-137.
- SRIKANTH, C.V.; MCCORMICK, B.A. Interactions of the intestinal epithelium with
20 the pathogen and the indigenous microbiota: a tree-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis.*, 2008.
- STECHER, B.; HARDT, W. D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol*, v. 16, p. 107-114. 2008.
- STEEL, J. H.; MALATOS, S.; KENNEA, N.; EDWARDS, A. D.; MILES, L.;
25 DUGGAN, P.; REYNOLDS, P. R.; FELDMAN, R. G.; SULLIVAM, M. H. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res.*, v. 57, p. 404-411, 2005.
- STREELMAN, A.; SNYDER, I.; SIX, E. Modifying effect of colicin on experimental *Shigella* keratoconjunctivitis. *Infect Immun*, v. 2, p.15–23, 1970.

- SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem*, v. 376, p. 952-965, 2003.
- 5 SUR, D.; RAMAMURTHY, T.; DEEN, J.; BHATTACHARYA, S.K. Shigellosis: challenges & management issues. *Indian J Med Res*, v. 120, p. 454-462, 2004.
- TAPPENDEN, K. A.; DEUTSCH, A. S. The physiological relevance of the intestinal microbiota - contributions to human health. *J Am Coll Nutr*, v. 26, p. 679S-683S, 2007.
- 10 THUM, C.; COOKSON, A. L.; OTTER, D. E.; McNABB, W. C.; HODGKINSON, A. J.; DYER, J.; ROY, N. C. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract? *J Nutr*, v. 142, p. 1921-1928, 2012.
- TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A.C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev*, v. 9, p. 107-116, 2010.
- 15 TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; KASER, A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterol.*, v. 136, p. 1476-1483. 2009.
- TRAUTNER, B. W.; HULL, R. A.; DAROUICHE, R. O. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J Antimicrob Chemother.*, v. 56, p. 413-415, 2005.
- 20 TUÑÓN, P.; JOHANSSON, K. E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gel. *J Biochem Biophys Methods*, v. 9, p. 171-179, 1984.
- VALEFF, C. N. *Atividade antagonista de extrato intracelular obtido de Fusobacterium necrophorum: modo de ação e caracterização bioquímica*. 2011. 144f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- 25 VAN DEN BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 31, p. 899-904, 2012.

- VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F. C. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Current Opin Microbiol*, v. 3, p.54–59, 2000.
- VENEMA, K. Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 13, p. 432-438, 2010.
- 5 VLAJINAC, H.; KRAJINOVIC, S. Colicine production as an epidemiological marker for *Shigella sonnei*. *J Hyg*, v. 91, p. 273-276, 1983.
- VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E. G.; de VOS, W. M.; HOEKSTRA, J. B. L.; NIEUWDORP, M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetol.*, v. 53, p. 606-613, 2010
- 10 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vaccine research development: new strategies for accelerating *Shigella* vaccine development. Weekly epidemiological record. Geneva, Switzerland. 72, 73-80, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhea and dysenteric mortality. Geneva, Switzerland. WHO/V&B/99.26,
- 15 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.8, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The initiative for vaccine research. Department
- 20 of immunization, vaccines and biologicals. Geneva, Switzerland. WHO/IVB/06.05, 2006.
- YAMAMOTO, Y.; TOGAWA, Y.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI M. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, p. 5746-5753, 2003.
- 25 ZHANG, Y.; LIN, K. A phylogenomic analysis of *Escherichia coli*/*Shigella* group: implications of genomic features associated with pathogenicity and ecological adaptation. *BMC Evol Biol*, v. 12, p. 174, 2012.

ANEXO A.

Amostra (a): caracterização

Quadro 1, Características dos íons detectados: sequências, massas moleculares e proteínas 100% similares - Amostra (a),

Amostra	Número de íons		Massas dos íons (Da)	Sequência dos peptídeos	Número de acesso (BLAST)	Descrição
	detectados	sequenciados				
(a3)	20	0	817,1; 833,1; 839,1; 855,1 871,1; 1022,2; 1044,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1249,2; 1271,1; 1638,9; 1639,4; 3003,7; 3090,8; 3276,9; 3292,9; 3390,0; 3439,9	-	-	-
(a7)	13	0	808,1; 833,1; 839,1; 855; 871; 1060,1; 1249,1; 1271,1; 1639,9; 3005,6; 3091,6; 3276,7; 3440,8	-	-	-
(a15)	18	0	817,2; 839,1; 833,1; 855,1; 861,1; 871,1; 879,1; 1022,2; 1044,2; 1060,1; 1066,2; 1082,1; 1249,2; 1271,2; 1476,2; 2987,9; 3167,9; 3183,9	-	-	-
(a16)	16	0	833,2; 839,2; 855,1; 861,2; 871,1; 877,1; 879,1; 881,1; 1044,2; 1066,2; 1060,2; 1082,2; 1271,2; 2927,1; 3129,9; 3309,1	-	-	-
(a20)	15	0	833,1; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 1060,1; 1066,1; 1077,3; 1082,1; 1271,1; 2717,7; 2931,6; 2846,8; 3129,7; 3308,9	-	-	-
(a24)	28	0	806,4; 824,4; 819,5; 826,4; 833,1; 835,4; 839,1; 855,1; 861,1; 862,5; 871,1; 973,5; 877,1; 877,4; 955,5; 960,5; 966,5; 972,5; 1044,2; 1046,6; 1060,1; 1066,1; 1077,3; 1082,1; 1083,6; 1235,6; 1791,8; 2384,1	-	-	-

(a26)	24	1	832,5; 833,1; 839,1; 855,1; 855,4; 861,1; 871; 877,1; 916,4; 933,4; 934,5; 1044,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1126,5; 1210,6; 219,7; 1376,7; 1411,7; 1441,7; 1480,7; 1621,8	-	-	-	
			1502,8	ANEAYLQGQLGNPK	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de FRUTOSE BISPHTOSPHATE ALDOLASE CLASS II de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-112, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (a27),	
(a27)	17	2	833,1; 855,1; 871,1; 877,1; 928,6; 1060,1; 1126,6; 1200,2; 1200,7; 1216,7; 1280,8; 1405,8; 1473,9; 2421,3; 2437,3	-	-	-	
			1502,9	ANEAYLQGQLGNPK	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de FRUTOSE BISPHTOSPHATE ALDOLASE CLASS II de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-112, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (a26),	
			2399,3	ANEAYLQGQLGNPKGE DQPNKK	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de FRUCTOSE-BISPHTOSPHATE ALDOLASE CLASS II de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-1112, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,	

			817,1; 820,5; 833,1; 839,1; 855,1; 861,1; 871; 877,1; 879; 881; 921,5; 956,6; 1022,1; 1044,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1271,1; 1304,7; 1305,7; 1369,7; 1456,8; 1473,9; 1639,8; 1697,8; 2026; 2094,1; 2125; 2249,1; 2399,3; 2466,3; 2705,3; 3008,5	-	-	-
(a28)	35	2				
			1675,8	LVSWYDNETGYSNK	ZP_14867459,1	Idêntico a um segmento de <i>GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE</i> , domínio C-terminal, de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66,
			2986,5	GANFDKYAGQDIVSNAS CTTNCLAPLAK	ZP_11526673,1	Idêntico a um segmento de <i>GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE</i> de <i>Shigella sonnei</i> S36, Sequência idêntica a da mesma proteína de outras bactérias,

809,5; 820,5; 833,1; 855,1; 861,1;
 871,1; 941,5; 1060,1; 1082,5; 1123,6;
 1161,7; 1243,7; 1247,7; 1251,7;
 1256,8; 1272,7; 1305,7; 1324,9;
 1433,8; 1449,8; 1456,8; 1460,8;
 1521,8; 1604,9; 1683,9; 1694,9;
 1698,8; 1743; 1764; 1954; 1968;
 1994; 2023; 2475,4; 2505,2; 2986,5

			984,5	QMQFFGAR	ZP_11527748,1	Idêntico a um segmento de FORMATE ACETYLTRANSFERASE 1 de <i>Shigella flexneri</i> 2850-71, Sequência muito curta para identificação, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(a29)	40	3	1238,8	NIVVILPSSGER	ZP_14868910,1	Idêntico a um segmento de CYSTEINE SYNTHASE A de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			1929,1	LVDKVIGITNEEAISTAR	ZP_14844206,1	Idêntico a um segmento de CYSTEINE SYNTHASE A de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			2195,2	(MQAAGAQAY)LVNTGW DGTGKR	ZP_14881932,1	Idêntico a um segmento de PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, A massa molecular de 2195,0 coincide com a do fragmento tripsínico (R) MQAAGAQAYLVNTGWDGTGKR, cuja região MQAAGAQAY é o segmento não sequenciado, Existe ainda uma substituição de N por D, Pode se tratar de mutação ou, mais provavelmente, desamidação de N (asparagina) para D (aspartato), Ver produto de MSMS 1991,1,

			833,1; 839,1; 855; 861,1; 871; 879; 967,5; 1060,1; 1066,1; 1403,7; 1491,9; 1495,9; 1681,8; 1764; 1860; 1869; 1928; 1968; 1991,1; 2460,3; 2717,3; 2719,4; 3333,7	-	-	-
			1343,7	TSTFLDVYIER	ZP_12381250,1	Idêntico a um segmento de FORMATE ACETYLTRANSFERASE 1 de <i>Shigella flexneri</i> 2747-71, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(a30)	26	3	1521,8	LTLTMPETMSLER	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de CYSTEINE SYNTHASE A de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			3235,7	(TTGPE)IWEDTDGQVD VFIAGVGTGGTLTGVS	NP_708269,1	Idêntico a um segmento de CYSTEINE SYNTHASE A de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, A região N-terminal, TTGPE, não pôde ser identificada no espectro, mas, a soma de massas monoisotópicas dos resíduos corresponde a 484,5 Da, Essas limitações são típicas de um peptídeo maior que 3000 Da, mas a sequência é inequívoca,

			833; 839; 855; 871; 877; 879; 1022; 1044; 1060; 1066; 1082; 1233,6; 1269,6; 1403,7; 1627,8; 1648,8; 1664,8; 1811,9; 1874,8; 1877,9; 1989; 2013; 2027; 2093; 2163; 2178,9; 2291; 2296; 2448; 2460,1; 2591,1; 2631,1; 2689,2; 2703,2; 2718,2			
			1626,8	IQGIGAGFIPANLDLK	NP_708269,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(a31)	39	4	1991	VKAPVIVQFSDGGASFIA GK	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de <i>FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-1112, a não ser por uma substituição de N por D, Pode se tratar de mutação ou, mais provavelmente, desamidação de N (asparagina) para D (aspartato), Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			2141	YLLQFNSNPANPEIHE K	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			2753,4	GVLKPGVELVEPTSGNT GNTGIALAYVAAAR	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

			817,1; 833,1; 839,1; 855,1; 861,1; 871; 877,1; 879; 881; 1022,1; 1044,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1084; 1491,9; 1575,9; 618,9; 2117,1; 2257,3; 3352,7; 3422,7; 3525,8; 3653,9; 3900,1	-	-	-
			1802,1	VIFLTADAFGLPPVSR	ZP_14881932,1	Idêntico a um segmento de <i>PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(a33)	29	4	1861,1	GVLTLNLGAVADTGIFTG R	ZP_14877031,1	Idêntico a um segmento de <i>PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			2608,4	LFIDNFDKYTDTPAGAAL VAAGPKL	ZP_14881932,1	Idêntico a um segmento de <i>PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Corresponde à região C-terminal da proteína, por este motivo, o resíduo C-terminal é leucina, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			3367,9	GKTDLISVAVEPTDSPVI AQALAGEEIKPGPHK	YP_404157,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-112, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(a34)	18	0	817,1; 833,1; 839,1; 855,1; 861,1; 871; 877,1; 1044,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1320,3; 1491,8; 2257,3; 2346,4; 2574,4; 2639,6; 2871,7	-	-	-

			833,1; 839,1; 855; 861,1; 871; 877; 879; 881; 1022,1; 1044,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1436,3; 1436,8; 1461,9; 1491,9; 1668; 3324,7; 3452,8; 3508,9	-	-	-
(a35)	23	2	2574,4	VINDNFGIIEGLMTTVHA TTATQK	ZP_14868118,1	Idêntico a um segmento de <i>GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66,
			2871,7	FTIAASFGNVHGVYKPG NVVLTPTILR	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de <i>FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE CLASS II</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(a37)	16	0	817; 833; 855; 870,9; 878,9; 1022; 1044; 1060; 1066; 1081,9; 1249; 1461,7; 1463,7; 1475,7; 1477,7; 1491,7	-	-	-
(a38)	18	0	817; 833; 839; 855; 861; 870,9; 877; 892,9; 1022; 1044; 1060; 1066; 1082; 1449,7; 1461,7; 1463,7; 1477,7; 1491,7	-	-	-
(a40)	27	0	833; 839; 855; 871; 877; 1060; 1082; 1413,8; 1435,7; 1447,8; 1451,7; 1461,8; 1463,7; 1475,8; 1477,8; 1485,7; 1489,8; 1491,8; 1499,7; 1505,8; 1511,8; 1515,7; 1519,8; 1527,8; 1541,8; 1543,7; 1577,8	-	-	-
(a41)	25	0	817,1; 833; 839; 855; 861; 871; 877; 1044,1; 1060; 1066,1; 1082; 1413,8; 1435,8; 1447,8; 1463,8; 1477,8; 1485,8; 1489,8; 1491,8; 1499,8; 1505,8; 1511,8; 1519,8; 1527,8; 1771,9	-	-	-

(a43)	9	0	833,1; 1060,1; 1428; 1462; 1478; 1492; 1506; 1612,1; 1773,2	-	-	-
(a45)	27	0	817,2; 833,1; 839,1; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 879,1; 881,1; 883,1; 893,1; 895; 897; 1022,2; 1044,2; 1046,7; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1084,1; 1271,1; 1427,9; 449,9; 1461,9; 1465,9; 1476; 1505,9	-	-	-

ANEXO B.

Amostra (b): caracterização

Quadro 2, Características dos íons detectados: sequências, massas moleculares e proteínas 100% similares - Amostra (b),

Amostra	Número de íons		Massas dos íons (Da)	Sequência dos peptídeos	Número de acesso (BLAST)	Descrição
	detectados	sequenciados				
(b19)	23	0	644,1; 650,1; 666,1; 682,1; 704,9; 732,9; 760,9; 789,0; 833,1; 839,2; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 893,1; 925,7; 969,7; 1013,8; 1057,8; 1060,1; 1066,2; 1145,8; 1189,9	-	-	-
(b20)	23	0	644,1; 650,1; 666,1; 682,1; 704,9; 732,9; 761,0; 789,0; 833,2; 839,2; 855,2; 861,2; 871,1; 877,2; 893,1; 1022,2; 1044,2; 1060,2; 1066,2; 1082,2; 1249,2; 1271,2; 1476,3	-	-	-
(b26)	35	2	628,5; 644,2; 666,2; 742,5; 833,2; 855,2; 871,2; 877,2; 892,7; 928,7; 968,7; 1060,2; 1066,3; 1082,2; 1125,7; 1126,7; 1200,3; 1216,8; 1219,8; 1247,8; 1249,9; 1280,9; 1369,0; 1405,9; 1411,9; 1439,0; 1503,0; 1590,1; 1617,1; 1697,1; 1748,1; 2091,3; 2271,5	-	-	-
			1604,1	AFDQIDNAPEEKAR	ZP_12375047,1	Idêntico a um segmento de <i>ELONGATION FACTOR Tu DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-671, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

			2399,6	ANEYLQGQLGNPKGED QPNKK	ZP_14869675,1	Idêntico a um segmento de FRUCTOSE-BISPHOPHATE ALDOLASE, CLASS II de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,	
			628,2; 644,2; 666,2; 711,3; 780,5; 820,6; 828,6; 833,2; 839,2; 855,2; 861,2; 871,2; 877,2; 892,7; 921,6; 956,7; 1027,8; 1044,3; 1060,2; 1066,3; 1082,3; 1084,8; 1120,7; 1200,3; 1200,8; 1264,9; 1280,9; 1304,9; 1329,9; 1340,9; 1369,9; 1405,9; 1438,9; 1474,0; 1562,1; 1578,0; 1698,0; 1706,1; 1711,1; 1774,2; 1804,2; 1867,1; 1995,3; 2094,3; 2103,3; 2125,3; 2249,4; 2326,5; 2421,5; 2437,5; 2459,5; 2467,6	-	-	-	
(b27)	55	3	1297,9	TVDGPSHKDWR	ZP_11526673,1	Idêntico a um segmento de GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE de <i>Shigella sonnei</i> 53G, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,	
			1676,0	LVSWYDNETGYSNK	ZP_11526673,1	Idêntico a um segmento de GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE de <i>Shigella sonnei</i> 53G, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,	
			2399,6	ANEYLQGQLGNPKGED QPNKK	ZP_14869675,1	Idêntico a um segmento de FRUCTOSE-BISPHOPHATE ALDOLASE, CLASS II de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,	

			628,2; 644,2; 650,2; 666,2; 682,2; 809,6; 817,3; 833,3; 839,3; 855,2; 861,3; 871,2; 877,2; 879,2; 893,2; 921,7; 967,7; 984,7; 999,8; 1022,3; 1044,3; 1060,3; 1066,3; 1082,3; 1098,3; 1161,9; 1212,9; 1251,9; 1271,3; 1284,0; 1305,9; 1325,1; 1370,0; 1434,1; 1450,0; 1457,0; 1461,1; 1490,1; 1623,1; 1640,1; 1676,1; 1684,2; 1695,2; 1720,2; 1743,2; 2010,3; 2023,3; 2094,4; 2195,5; 2359,6; 2466,7; 2501,7; 2870,8; 3008,9; 3024,9; 3091,0	-	-	-
						Idêntico a um segmento de <i>SERYL-tRNA SYNTHETASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Cisteína modificada pelo grupamento carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(b28)	61	5	1699,1	EISSCSNWDFQAR	ZP_14871445,1	
						Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A DOMAIN A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Peptídeo presente na amostra (a30), Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			1929,4	LVDKVIGITNEEAISTAR	ZP_14844206,1	
						Idêntico a um segmento de <i>FORMATE ACYLTRANSFERASE 1</i> de <i>Shigella sonnei</i> 3226-85, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			1994,3	SEPIKGDVLNYDEVMER	ZP_14858676,1	
						Idêntico a um segmento de <i>GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE-DEHYDROGENASE</i> de <i>Shigella sonnei</i> 53G, Duas cisteínas estão modificadas pelo grupamento carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			2986,9	GANFDKYAGQDIVSNAS CTTNCLAPLAK	ZP_11526673,1	
						Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			2475,3	LQEDESFTNKNIVILPS SGER	ZP_14844206,1	

606,3; 614,5; 628,3; 630,2; 637,5;
 644,2; 650,2; 656,3; 666,2; 711,4;
 713,4; 715,4; 733,0; 739,4; 755,4;
 757,4; 761,0; 789,1; 839,3; 855,3;
 861,3; 877,3; 1066,4; 1218,1; 1234,0;
 1404,1; 1437,1; 1581,1; 1627,3;
 1673,3; 1869,3; 1928,4; 2027,6;
 2093,6; 2141,6; 2291,6; 2296,7;
 2428,7; 2460,8; 2534,8; 2624,8;
 2631,8; 2704,0; 2716,7; 2754,1;
 2774,0; 2873,9; 2933,1; 3199,2;
 3236,3; 3309,4; 3650,6; 4329,0;
 4356,8; 4424,9

(b30)

57

2

2321,6

(LATAW)EGFTKGDWQN
 EVNVR

ZP_12884382,1

Sequência parcial: EGFTKGDWQNEVNVR, Idêntico a um segmento de **FORMATE ACETYLTRANSFERASE** de *Shigella sonnei* str, Moseley, Não é possível assinalar a região N-terminal da sequência com base no espectro apresentado, Entretanto, o fragmento tripsínico (K)LATAWEGFTKGDWQNEVNVR tem massa molecular calculada de 2321,1 Da, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

1875,1

THNQGVDVYTPDILR

ZP_12884382,1

Idêntico a um segmento de **FORMATE ACETYLTRANSFERASE** de *Shigella sonnei* str, Moseley, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

606,1; 628,1; 644,1; 650,1; 656,1;
 659,3; 666,1; 668,2; 672,1; 682,0;
 704,8; 732,9; 746,9; 760,9; 774,9;
 788,9; 833,1; 839,1; 855,1; 861,1;
 871,1; 877,1; 1060,1; 1066,1; 1082,1;
 1233,7; 1269,8; 1445,9; 1647,0;
 1740,0; 1846,1; 1875,1; 1991,2;
 1999,1; 2003,2; 2072,2; 2093,2;
 2163,2; 2228,3; 2291,3; 2364,3;
 2424,4; 2427,4; 2448,3; 2533,4;
 2549,5; 2676,6; 2730,5; 2824,7;
 2909,8; 2913,5; 2952,7; ; 3022,7;
 3129,7; 3183,9; 3236,8; 3368,0;
 3390,9; 3525,9; 3655,0; 3713,0;
 3779,1; 4370,3

(b31)

66

3

2027,2	SKIFEDNSTIGHTPLVR	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Correspondente À região amino-terminal da proteína, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2141,2	YLLQFNSNPANPEIHE K	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2753,7	GVLKPGVELVEPTSGNT GIALAYVAAAR	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

644,2; 650,2; 666,1; 713,3; 757,3;
833,2; 855,2; 861,2; 871,2; 877,2;
915,7; 1066,2; 1162,8; 1171,9;
1293,8; 1368,9; 1456,0; 1576,1;
1593,0; 1609,1; 1631,1; 1639,1;
1647,1; 1781,2; 1846,3;; 1866,3;
1901,2; 1951,3; 1962,3; 2003,3;
2027,4; 2087,4; 2092,4; 2100,4;
2157,4; 2257,5; 2273,5; 2364,5;
2387,6; 2490,5; 2548,6; 2558,7;
2608,7; 2727,8; 2952,8; 3064,9;
3071,0; 3097,9; 3330,1; 3414,0;
3424,0; 3526,2; 3538,2; 3587,1;
3654,3; 3769,3; 3867,3; 3886,3;
4052,3; 4371,6; 4580,7; 4829,7

(b32)

67

6

1802,3	VIFLTADAFGVLPPVSR	ZP_14881932,1	Idêntico a um segmento de PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
1861,3	GVLTLNLGAVAVDTGIFT GR	ZP_14877031,1	Idêntico a um segmento de PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2117,4	YLSTALFADLFTEKELQ Q	ZP_14844206,1	Idêntico a um segmento de CYSTEINE SYNTHASE A de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Corresponde à região C-terminal da proteína, Por isto, o fragmto não tem arginina (R) ou lisina (K) como residuo C-terminal,
2291,3	EMLLDAMENPEKYPQLT IR	ZP_14858676,1	Idêntico a um segmento de FORMATE ACETYLTRANSFERASE de <i>Shigella sonnei</i> 3226-85, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
3368,2	GKTDLISVAVEPTDSPVI AQALAGEEIKPGPHK	YP_404157,1	Idêntico a um segmento de CYSTEINE SYNTHASE A de <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, Sequencia idêntica a da mesma proteína de outras bacterias,

ANEXO C.

Amostra (b+c): caracterização

Quadro 3, Características dos íons detectados: seqüências, massas moleculares e proteínas 100% similares - Amostra (c+d),

Amostra	Número de íons		Massas dos íons (Da)	Seqüência dos peptídeos	Número de acesso (BLAST)	Descrição
	detectados	sequenciados				
(c7)	14	0	606,2; 630,1; 649,3; 649,3; 682,0; 687,3; 704,0; 713,2; 720,0; 739,2; 757,2; 793,2; 893,1; 909,1	-	-	-
(a13)	13	0	628,1; 649,3; 666,1; 713,2; 757,2; 833,1; 855,1; 871,1; 877,1; 893; 1060,1; 1066,1; 1098,1	-	-	-
(c19)	11	1	649,3; 666; 713,2; 855,1; 877,1; 934,5; 1060,1; 1210,6; 1502,8; 1575,8 1450,8	IAEQEGIAEDGYR	YP_408376,1	Idêntico a um segmento de <i>PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDASE</i> de <i>Shigella boydii</i> Sb227, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (c25),
(c22)	19	0	623,4; 649,4; 666,1; 728,4; 778,4; 802,5; 824,5; 828,5; 845,5; 846,5; 855,1; 877,1; 891,5; 893,1; 915,5; 935,5; 937,5; 953,5; 1231,7	-	-	-
(c23)	30	0	649,4; 666,1; 711,3; 802,5; 826,5; 828,5; 835,4; 847,5; 855,1; 858,5; 871,1; 891,5; 915,5; 935,5; 955,5; 966,5; 967,5; 985,6; 1009,6; 1045,6; 1046,6; 1062,6; 1067,6; 1083,6; 1119,6; 1158,6; 1231,7; 1276,7; 1516,9; 1827,1	-	-	-

(c24)	42	2	713,4; 760,4; 791,4; 805,4; 813,4; 826,5; 827,4; 837,4; 845,5; 858,5; 877,1; 877,5; 898,5; 930,5; 946,5; 951,5; 953,4; 959,6; 966,5; 968,6; 970,5; 988,5; 1017,5; 1070,5; 1186,7; 1204,7; 1208,7; 1210,6; 1326,6; 1329,6; 1419,7; 1497,8; 1516,8; 1575,8; 1844,0; 2384,1; 2717,3; 3223,5; 3312,5	-	-	-
			908,5	AQFEEER	ZP_14870421,1	Idêntico a um segmento de <i>TRANSLATION ELONGATION FACTOR Ts</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Este fragmento isoladamente não é suficiente para a identificação da proteína,
			1304,7	YSYVDENGETR	ZP_14872020,1	Idêntico a um segmento de <i>DNA-BINDING PROTEIN H-NS</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(c25)	35	2	650,1; 666; 773,4; 805,4; 835,5; 855,1; 861,1; 861,5; 871; 877,1; 893; 934,5; 947,5; 953,5; 980,5; 1066,1; 1082,1; 1130,6; 1210,6; 1219,7; 1304,7; 1371,8; 1406,7; 1411,7; 1472,7; 1480,7; 1488,7; 1502,8; 1537,8; 1621,8; 1662,7; 1766,8; 3312,4	-	-	-
			1450,8	IAEQEGIAEDGYR	YP_408376,1	Idêntico a um segmento de <i>PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDASE</i> de <i>Shigella boydii</i> Sb227, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (c19),
			1575,8	REEESAAAAEVEER	ZP_14872020,1	Idêntico a um segmento de <i>DNA-BINDING PROTEIN H-NS</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66,

742,5; 803,5; 828,5; 861,5; 886,5;
 908,5; 928,6; 942,6; 947,6; 964,6;
 972,6; 1007,6; 1027,5; 1057,7;
 1072,6; 1087,7; 1093,5; 1095,6;
 1110,6; 1115,7; 1125,6; 1126,6;
 1148,7; 1172,7; 1178,6; 1201,7;
 1203,7; 1216,7; 1219,7; 1227,7;
 1236,7; 1240,7; 1257,7; 1259,7;
 1280,8; 1290,8; 1302,8; 1324,8;
 1336,8; 1359,8; 1368,8; 1390,8;
 1405,8; 1411,8; 1432,8; 1442,8;
 1450,8; 1458,8; 1473,9; 1480,8;
 1485,9; 1493,8; 1510,8; 1520,9;
 1524,9; 1540,9; 1576,9; 1691,9;
 1696,9; 1747,9; 1770,9; 1823;
 2001,2; 2018,2; 2399,4; 3337,4

(c26)

71

5

957,6	LEVVVNER	NP_707143,1	Idêntico a um segmento de <i>GLOBAL DNA-BINDING TRANSCRIPTIONAL DUAL REGULATOR H-NS</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Este fragmento isoladamente não é suficiente para a identificação da proteína,
1368,7	NADALTLQAPAQR	ZP_14871635,1	Idêntico a um segmento de <i>GLUCOSE-1-PHOSPHATASE DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
1437,8	ISPTFTEESDGVR	ZP_11529498,1	Idêntico a um segmento de <i>PROTEÍNA HIPOTÉTICA SF245T_0434</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 245T, Sequência idêntica à de outras proteínas hipotéticas de outras bactérias,

			1502,9	ANEAYLQGQLGNPK	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de <i>FRUCOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE CLASS II</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-1112, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(c26)	71	5				Idêntico a um segmento de <i>GLUCOSE-1-PHOSPHATASE/ISOSITOL PHOSPHATASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> Sd-197, com exceção de uma substituição de Asn (N) por Asp(D), Pode se tratar de mutação ou desamidação de asparagina, Reparar que este peptídeo e o peptídeo de 2125,1 Da, amostra (c27), aparecem em frações cromatográficas subsequentes e que o peptídeo mais hidrofílico foi eluído antes, conforme esperado, Observar a diferença nos espectros causada por esta mudança; a quebra da ligação peptídica após o ácido aspártico é bastante favorecida, de acordo com os mecanismos mais aceitos de fragmentação da cadeia peptídica por MS/MS, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
(cont.)	(cont.)	(cont.)	2126,1	SGECPPPDVYAYADSL QR	YP_402638,1	

650,1; 819,5; 820,5; 842,5; 855,1;
 860,5; 871,1; 876,5; 877,1; 893,1;
 911,6; 921,5; 924,6; 963,6; 1021,6;
 1027,7; 1031,7; 1037,6; 1047,7;
 1060,7; 1069,6; 1073,6; 1079,6;
 1093,6; 1110,6; 1170,7; 1233,7;
 1255,7; 1264,7; 1290,8; 1304,8;
 1320,8; 1333,8; 1369,8; 1414,9;
 1445,8; 1505,9; 1516,9; 1577,9;
 1621,9; 1639,9; 1646; 1675,9; 1683;
 1685; 1701,1; 1766; 1773; 1783;
 1853,1; 1926; 2026,1; 2039,1;
 2216,2; 2232,3; 2249,2; 2252,3;
 2354,3; 2459,3; 2466,4; 2468,4;
 2587,3; 2603,3; 2705,3; 3255,5;
 3271,5; 3305,5; 3345,5; 3349,5;
 3362,5; 3367,5; 3514,6

(c27)

78

7

980,6	LWYNQEK	ZP_14821306,1	Idêntico a um segmento de <i>PROTEÍNA HIPOTÉTICA SF 285071_1081</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2850-71, Por ser um fragmento peptídico muito pequeno e por ser uma proteína sem função conhecida, não ha identificação garantida, Sequência idêntica à de outras proteínas hipotéticas de outras bactérias,
1320,8	LAEICGWTQSR	YP_005456628,1	Idêntico a um segmento de <i>PROTEINA LACONICAMENTE CHAMADA DE REGULATOR</i> de <i>Shigella sonnei</i> 53G, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Entretanto, a identificação é bem duvidosa devido à qualidade baixa do espectro e ao fato de que esta sequência não parece ocorrer em outras espécies de <i>Shigella</i> ,
1473,9	VIGITNEEAISTAR	ZP_14844206,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica a da mesma proteína de outras bactérias,

			1498,9	IEVYQSAEQLR	ZP_14871635,1	Idêntico a um segmento de GLUCOSE-1-PHOSPHATASE DOMAIN PROTEIN de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
			1827,0	EHEDTLAGIEATGVTQ	NP_707180,1	Idêntico a um segmento de PROTEÍNA HIPOTÉTICA SF 1275 de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Sequência idêntica à de outras proteínas hipotéticas de outras bactérias,
(c27)	78	7				
(cont.)	(cont.)	(cont.)	2125,1	SGECPPPDVYAYANSL QR	YP_402638,1	Idêntico a um segmento de GLUCOSE-1-PHOSPHATASE/ISOSITOL PHOSPHATASE de <i>Shigella dysenteriae</i> Sd-197, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
			2565,3	VQDQNIPELNVCYGT QMH	ZP_14881294,1	Idêntico a um segmento de S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Clivagem incomum por tripsina após His no C-terminal, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias

842,5; 861,2; 877,1; 912,6; 956,6;
 999,7; 1048,6; 1093,6; 1104,7;
 1170,7; 1190,7; 1251,7; 1254,7;
 1272,8; 1305,8; 1456,9; 1516,9;
 1543,9; 1605; 1610,8; 1661; 1684;
 1694; 1702; 1708; 1743,1; 1839;
 1839,5; 1893,1; 1926,1; 1954,1;
 1962,1; 2027,1; 2098,3; 2448,2;
 2451,3; 2463,5; 2466,4; 2582,4;
 2986,6; 3090,7; 3292,8; 3586; 3620;
 3633; 3660; 3663,6; 3669,2; 3686,8;
 3693,1; 3699,1; 3715; 3720,1;

			1284,0	NIVVILPSSGER	NP_708269,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
(c28)	58	5	1968,2	IPYVESFPTGTPQSPYK	YP_402380,1	Idêntico a um segmento de <i>UDP-GALACTOSE-4-EPIMERASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
			2093,2	LPSCGFSAQAVQALAACGER	NP_707554,1	Idêntico a um segmento de <i>GLUTAREDOXIN-4</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Há duas cisteínas modificadas com o grupamento carboxila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
			2505,3	LASAHYYDELPTEGNEHGQAFR	ZP_14845245,1	Idêntico a um segmento de <i>FUMARATE HYDRATASE CLASS I</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
			3676,7	VQDQNQIPELNVYQCGTYQMHSLEAQDIAR	ZP_14881294,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

993,6; 1081,7; 1125,7; 1343,9;
 1403,9; 1421,9; 1450,9; 1496; 1522;
 1572; 1812,2; 1860,1; 1890,2;
 1904,1; 1968,2; 1991,2; 2008,2;
 2062,4; 2174,2; 2440,4; 2463,5;
 2505,6; 2584,5; 2590,6; 2684,5;
 2717,4; 2862,8; 2917,6; 3041,8;
 3090,8; 3198,8; 3335; 3357; 3677,2;
 4327,8; 4356,6

(c29)

41

5

1652,8	LVGGCDIVIEMYQR	YP_310438,1	Idêntico a um segmento de <i>PROTEÍNA HIPOTÉTICA SSON_1502</i> de <i>Shigella sonnei</i> Ss046, Cisteína modificada por grupo carbamidometila,
1715,0	TGFYMSLIGTPDEQR	ZP_14881294,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2097,3	NHLNGDGVEIIDISPMG CR	ZP_14881294,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, com uma substituição de Asn (N) por Asp (D) no resíduo 6 deste peptídeo, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2299,4	VAEIMVDQGLSDDFYAE QLR	ZP_14846840,1	Idêntico a um segmento de <i>S-FORMYLGLUTATHIONE HYDROLASE</i> de <i>Shigella boydii</i> 965-58, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
3235,9	TTGPEIWEDTDGQVDVF IAGVGTGGTLTGVS	NP_708269,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 301, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

666,1; 855,1; 861,1; 874,5; 877,1;
 883,6; 890,6; 893,1; 993,6; 1058,7;
 1081,6; 1136,7; 1166,7; 1269,8;
 1368,8; 1400,8; 1442,9; 1500,9;
 1627,1; 1631; 1661; 1715; 1728;
 1772,1; 1812,1; 1869,1; 1875,1;
 1878,1; 1963,1; 2008,2; 2048,1;
 2163,2; 2307,4; 2341,4; 2407,4;
 2448,3; 2524,5; 2591,5; 2618,5;
 2676,5; 2719,6; 2778,6; 2782,5;
 2806,5; 2914,5; 2931,6; 3049,7;
 3197,7; 3235,8; 3421,1; 3442,9;
 3551,9; 3677; 3784,2; 3854,3;
 3945,4; 4187,6; 4426,7

(c30)

63

5

1563,9	FAYVDILQNPN DIR	ZP_14872709,1	Idêntico a um segmento de <i>GLUTAREDOXIN-4</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
1788,0	TMNTPHGDAITVFDLR	ZP_11532308,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 2457T, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
1981,2	EIPSDIVYQDDLVTAFR	ZP_08392122,1	Idêntico a um segmento de <i>PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDASE</i> de <i>Shigella</i> sp, D9, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2141,3	YLLQFNSNPANPEIHE K	NP_708269,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a, str, 301, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2753,7	GVLKPGVELVEPTSGNT GLAYVAAAR	ZP_14844205,1	Idêntico a um segmento de <i>CYSTEINE SYNTHASE A</i> de <i>Shigella flexneri</i> K-404, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

649,3; 692,4; 945,6; 1020,5; 1036,6;
 1044,5; 1135,6; 1171,8; 1267,7;
 1269,8; 1368,8; 1577,9; 1605,9;
 1709,9; 1817; 1844; 1852; 1941;
 2040,2; 2092,1; 2141,2; 2214,2;
 2227,3; 2304,2; 2408,3; 2470,2;
 2520,3; 2667,4; 2746,5; 2771,5;
 2820,6; 2900,7; 2929,6; 2974,5;
 3065,6; 3084,7; 3107,7; 3126,7;
 3164,7; 3235,7; 3326,7; 3369;
 3518,9; 3680; 3712; 3895,9; 3898,1;
 3917,1; 3946,3; 4060,2; 4086,3;
 4187,6; 4210,4; 4372,6; 4488,7; 4712

(c31)	61	5	1511,7	GGVLEVYMGHYMR	ZP_14871634,1	Idêntico a um segmento de <i>GLUCOSE-1-PHOSPHATASE DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			1534,8	AWDAWVVAGHAPVR	YP_001880601,1	Idêntico a um segmento de <i>ENDORIBONUCLEASE L-PSP FAMILY PROTEIN</i> de <i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			1822,0	YANWPTFPQLWVDGK	YP_310438,1	Idêntico a um segmento de <i>PROTEÍNA HIPOTÉTICA SSON_1502</i> de <i>Shigella sonnei</i> Ss046,
			2448,2	MNIDTDTQWATWEGVL NYYK	ZP_14869675,1	Idêntico a um segmento de <i>FRUCTOSE BISPHOSPHATE ALDOLASE, CLASS II</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
			3569,9	(EANNLGIPVFAIV)DTNS DPDGVDFVIPGNDDAIR	ZP_14875634,1	Idêntico a um segmento de <i>RIBOSOMAL PROTEIN S2</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

(c32)	47	1	649,3; 666,1; 1129,7; 1324,8; 1399; 1454,9; 1534,9; 1619; 1802,1; 1820; 1841,1; 2037,2; 2158,3; 2214,2; 2257,4; 2317,3; 2334,3; 2435,3; 2549,3; 2606,4; 2747,6; 2772,6; 2871,8; 2885,7; 2915,8; 2930,7; 2966,7; 3004,6; 3065,7; 3090,6; 3106,5; 3177,7; 3199,7; 3215,7; 3236,8; 3352,9; 3413,8; 3564; 3586,9; 3742,6; 3756,9; 3899,2; 4126,6; 4519,6; 4681,9; 4845,9
-------	----	---	--

- - -

2110,2

GEIMPNIQMSAFWYAV
R

ZP_14875674,1

Idêntico a um segmento de *MALTOSE-BINDING PERIPLASMIC DOMAIN PROTEIN* de *Shigella flexneri* 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

649,3; 666,1; 855,1; 861,2; 877,1;
 893,1; 1066,7; 1266,9; 1368,9; 1399;
 1423,9; 1436,4; 1436,9; 1460; 1566;
 1578; 1619; 1668,1; 1685; 1745,1;
 1941,1; 2008,3; 2112,3; 2130,3;
 2257,4; 2297,4; 2346,4; 2377,4;
 2457,4; 2493,4; 2512,5; 2574,5;
 2747,6; 2805,5; 2815,5; 2827,8;
 2837,2; 2843,6; 2855,8; 2858,4;
 2885,7; 2893,8; 2909,8; 3003,8;
 3134,7; 3235,8; 3289,8; 3321,9;
 3459,9; 3500,1; 3563; 3572,1;
 3672,3; 3847,4; 3932,4; 4124,5;
 4581; 4680,2

(c33) 61 3

1282,9

MIPVLWPSAR

YP_005456405,1

Idêntico a um segmento de *PUTATIVE PLASMID STABILIZATION-LIKE PROTEIN FROM PROPHAGE* de *Shigella sonnei* 53G, Identificação não inequívoca devido ao pequeno tamanho do peptídeo e também porque esta sequência não aparece em outras espécies de *Shigella*,

1540,0

LLPWIDGLLDAGEK

ZP_11643108,1

Idêntico a um segmento de *FRUCOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE CLASS II* de *Shigella dysenteriae* CDC 74-1112, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

2871,8

FTIAASFGNVHGVYKPG
 NVVLTPTILR

ZP_14869675,1

Idêntico a um segmento de *FRUCTOSE BISPHOSPHATE ALDOLASE CLASS II* de *Shigella flexneri* 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

			649,3; 666,1; 861,2; 877,1; 893,1; 1266,9; 1443,9; 1668,1; 1745,1; 1889,1; 2064,2; 2436,4; 2704,6; 2871,8; 2907,7; 3236,8; 3381; 3459,9; 3508,1; 3508,6; 3572,1; 3672,3; 4112,2				
				1580,0	ELVELFFEEIRR	ZP_14867443,1	Idêntico a um segmento de <i>INTEGRATION HOST FACTOR, ALPHA SUBUNIT</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (c35),
(c34)	27	4		2264,3	(KEE)IYIMYILFDCVSAN R	ZP_14880596,1	Idêntico a um segmento de <i>NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE NUDI</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, A sequência completa (R)KEEIYIMYILFDCVSANR corresponde à massa calculada de 2264,1, mas não é possível atribuir a região KEE neste espectro, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
				2885,7	HGGQEVYHIHMHLGG RPLGPMLAHK	NP_836807,1	Idêntico a um segmento de <i>PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 2457T, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
				4122,2	(SDVPQG)AAILGAISGA HHVHQMAEHYGVVILH TDHCAK	ZP_11643108,1	Idêntico a um segmento de <i>FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE CLASS II</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> CDC 74-1112, Peptídeo muito grande para o sequenciamento correto, mas a identificação da proteína parece correta, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

855,1; 861,2; 877,1; 893,1; 995,7;
 1066,7; 1189,9; 1257,9; 1282,9;
 1363,8; 1395,9; 1399; 1443,9; 1460;
 1498; 1535; 1645; 1668,1; 1684,1;
 1690,1; 1693,1; 1701,1; 1706,1;
 1739,2; 1745,1; 1755,1; 1772,2;
 1889,2; 1973,3; 1995,2; 2024,3;
 2062,7; 2063,2; 2117,4; 2149,3;
 2186,5; 2202,4; 2216,3; 2257,5;
 2436,5; 2519,6; 2668,8; 2782,7;
 2794,7; 2838,8; 2871,9; 2872,4;
 2885,8; 2898,8; 2901,8; 2907,8;
 2926,8; 2928,8; 2936,7; 3032,9;
 3125,9; 3381; 3494,8; 3753,3; 4232,8

(c35)	65	4	1341,8	GIHTLEHLFAGF	ZP_11532308,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 2457T, Este peptideo tem uma fenilalanina na extremidade C-terminal, indicando que a clivagem não foi catalisada por tripsina, Entretanto, a clivagem no N-terminal após arginina (R) é tipicamente tripsínica, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias
			1580,0	ELVELFFEEIRR	ZP_14867443,1	Idêntico a um segmento de <i>INTEGRATION HOST FACTOR, ALPHA SUBUNIT</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (c34),
			1629,0	GIHTLEHLFAGFMR	ZP_11532308,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> , Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual nas amostras (c36), (c38) e (c39),
			3507,2	ITVLVGHDSNIASLLTAL DFKPYQLHDQNER	ZP_14871635,1	Idêntico a um segmento de <i>GLUCOSE-1-PHOSPHATASE DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> 1235-66, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

606,2; 644,2; 649,4; 650,1; 666,1;
 672,2; 682,1; 713,3; 757,3; 815;
 855,2; 877,2; 893,1; 1396; 1460,2;
 1645,1; 1668,1; 1693,1; 1772,2;
 2063,2; 2186,4; 2202,4; 2216,3;
 2257,5; 2281,5; 2479,6; 2563,5;
 2668,7; 2838,7; 2871,8; 2885,7;
 2926,8; 3032,9; 3508,1; 3752,2;
 3975,5; 4062,2; 4124,5; 4162,5;
 4229,7; 4251,6

(c36)

43

2

1629,0

GIHTLEHLFAGFMR

ZP_11532308,1

Idêntico a um segmento de *S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE* de *Shigella flexneri*, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias. Igual nas amostras (c35), (c38) e (c39),

2024,2

DPNTLVGLPLIALCQML
R

ZP_12321877,1

Idêntico a um segmento de *MAF-LIKE PROTEIN YCEF DOMAI PROTEIN* de *Shigella dysenteriae* 155-74, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,

649,3; 666; 814,9; 816,4; 833,1;
 839,1; 855,1; 861,1; 871; 877; 886,5
 893; 1060,1; 1066,1; 1082,1; 1149,7;
 1282,1; 1282,7; 1323,7; 1584,9;
 1613,8; 1615,5; 1628,9; 1644,9;
 1650,9; 1660,8; 1666,8; 1669;
 1689,8; 1692,9; 1988,5; 2024,1;
 2378,2; 2436,2; 2479,4; 2502,2;
 2506,3; 2519,3; 2545,3; 2549,1;
 2571,2; 2579,3; 2584,3; 2587,3;
 2590,3; 2597,4; 2601,2; 2668,5;
 2688,4; 2756,6; 2838,5; 2871,6;
 2885,5; 2909,6; 2926,6; 2938,5;
 3032,6; 3235,6; 3245,6; 3275,8;
 3380,7; 3396,7; 3507,9; 3676,8;
 3751,9; 3799; 3977,2; 3997,2;
 4063,9; 4126,2; 4393,5

(c37)

74

3

1772,0	FVISLCHGPA AFLALR	ZP_14878794,1	Idêntico a um segmento de <i>CHAPERONE PROTEIN hchA</i> de <i>Shigella dysenteriae</i> 225-75, Cisteína modificada por grupo carbamidometila, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias,
2281,3	VQPGDSVAVFGLGAIGL AVVQGAR	YP_309347,1	Idêntico a um segmento de <i>ALCOHOL DEHYDROGENASE</i> de <i>Shigella sonnei</i> Ss046,
2563,3	ECTLETLEEMLEKLEVV VNER	NP_707143,1	Idêntico a um segmento de <i>GLOBAL DNA-BINDING TRANSCRIPTIONAL DUAL REGULATOR H-NS</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a, str, 301, Cisteína modificada por grupo carbamidometila,

(c38)	34	1	649,3; 815; 815,5; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 893,1; 1082,1; 1584,9; 1613,9; 1615,6; 1644,9; 1650,9; 1666,9; 1672,9; 1688,9; 1690,9; 1772,1; 2257,4; 2281,4; 2378,3; 2571,4; 2588,4; 2597,5; 2838,6; 2871,7; 2885,7; 2909,7; 3677; 3799,1; 3975,4; 4125,5	-	-	-
			1629,0	GIHTLEHLFAGFMR	ZP_11532308,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> , Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual nas amostras (c35), (c36) e (c39),
(c39)	47	1	628,1; 644,1; 649,3; 682; 815; 817,2; 833,1; 839,1; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 893,1; 1044,2; 1060,1; 1066,2; 1082,1; 1582,9; 1584,9; 1595,3; 1613,9; 1615,6; 1629; 1645; 1650,9; 1666,9; 1672,9; 1689,9; 1692,9; 1728,1; 1772,1; 2257,4; 2281,4; 2378,3; 2571,4; 2588,5; 2597,5; 2668,6; 2688,5; 2753,7; 2838,6; 2871,8; 2885,7; 2897,7; 3677; 3799,1; 4125,4	-	-	-
			1629,0	GIHTLEHLFAGFMR	ZP_11532308,1	Idêntico a um segmento de <i>S-RIBOSYLHOMOCYSTEINE LYASE</i> de <i>Shigella flexneri</i> , Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual nas amostras (c35), (c36) e (c38),
(c40)	24	1	666,1; 815; 816; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 893,1; 1082,1; 1443,1; 1534,9; 1585; 1614; 1629; 1645; 1651; 1666,9; 1772,1; 2688,6; 2700,6; 2871,8; 2885,7; 3235,8	-	-	-
			2571,4	IQPGYDHSYYFIASFIED HLR	ZP_11529294,1	Idêntico a um segmento de <i>ESTERASE yeiG DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 2457T, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (c41),

(c41)	25	1	606,2; 628,1; 650,1; 666,1; 713,3; 833,1; 839,2; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 893,1; 1066,2; 1082,1; 1629; 1645; 1650,9; 1666,9; 1772,1; 2871,7; 2885,7; 3236,8; 3678; 4125,4	-	-	-
			2571,4	IQPGYDHSYYFIASFIED HLR	ZP_11529294,1	Idêntico a um segmento de <i>ESTERASE yeiG</i> <i>DOMAIN PROTEIN</i> de <i>Shigella flexneri</i> 2a str, 2457T, Sequência idêntica à da mesma proteína de outras bactérias, Igual na amostra (c40),
(c42)	20	0	650,1; 666,1; 666,2; 855,1; 861,1; 871,1; 877,1; 893,1; 895,1; 909; 1066,1; 1082,1; 1098,1; 1293,2; 1309,2; 1443,1; 1629; 1644,9; 2572,4; 3236,8	-	-	-
(c43)	9	0	649,3; 671,3; 687,2; 855,1; 877; 893; 1628,9; 1644,8; 2572,2	-	-	-
(c44)	12	0	630,1; 649,3; 663,3; 665,3; 671,3; 681,3; 687,3; 703,2; 711,2; 713,2; 755,2; 777,2	-	-	-