

JAQUELINE SILVANA MOREIRA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIA
ANTAGONISTA PRODUZIDA POR *Shigella sonnei***

BELO HORIZONTE

2011

JAQUELINE SILVANA MOREIRA

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIA
ANTAGONISTA PRODUZIDA POR *Shigella sonnei*

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientadores: Luiz de Macêdo Farias e Mireille Ângela Bernardes Sousa

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

BELO HORIZONTE

2011

LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios
Departamento de Microbiologia

Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

APOIO FINANCEIRO

CNPq
FAPEMIG
CAPES
PRPQ/UFMG
TWAS

MOREIRA, Jaqueline Silvana.

**EXTRAÇÃO PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA PRODUZIDA POR *Shigella sonnei***

Monografia: Especialização em Microbiologia

1- bacteriocina

2- *Shigella sonnei*

3- substância antagonista

4- purificação proteína

I. Universidade Federal de Minas Gerais

II. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, Nerza Alves dos Santos e Afonso Moreira dos Santos, e ao meu noivo e amor da minha vida, Jamil Silvano de Oliveira, por todo carinho amor e compreensão.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me carregar no colo em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Paula Prazeres Magalhães, por me acolher em seu projeto de pesquisa e permitir a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Professor Luiz de Macêdo Farias, pelo auxílio neste trabalho e pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

À minha coorientadora, Doutora Mireille Ângela Bernardes Sousa, pelos ensinamentos em Microbiologia e por ceder gentilmente às amostras empregadas nesta pesquisa.

À Professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, por permitir a minha presença no grupo e a realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

À Professora Simone Gonçalves dos Santos, pelo incentivo e atenção.

Ao Professor Marcelo Matos Santoro, por permitir a realização de parte deste trabalho no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas.

Aos meus pais, Nerza Alves dos Santos e Afonso Moreira dos Santos, que são um exemplo de amor, dedicação, carinho, luta e perseverança. Por serem a luz dos meus dias e por estarem presentes dando-me força e coragem, sempre.

Ao meu amor, meu noivo Jamil Silvano de Oliveira, pelo carinho, amor, compreensão, incentivo, inúmeros ensinamentos, por ser o meu braço direito neste projeto de pesquisa e por sempre me ajudar.

Aos meus irmãos, Celso, Lúcio, Toninho e Lelei, que perto ou longe sempre torcem por mim.

À Luzia Rosa Rezende e ao José Sérgio Barros de Souza, ambos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, pela amizade e ajuda neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios por todo o auxílio e pelos momentos felizes.

Aos meus afilhados Ana Luíza Alves Braga Trindade e João Vitor Alves Braga Trindade, pelo sorriso, alegria e por estarem sempre perto.

À minha amiga Alícia Alves de Queiros, pelos conselhos e por sempre estar ao meu lado.

Ao corpo docente pelos ensinamentos em microbiologia e por fazer despertar em mim um apreço ainda maior nesta área.

A todos os meus amigos.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 <i>Shigella</i> E ENTERITE AGUDA	1
1.2 BACTERIOCINAS	2
2 JUSTIFICATIVA	4
3 OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4 MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	6
4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO INTRACELULAR	6
4.2.1 DIÁLISE DO EXTRATO PROTEICO	7
4.2.2 DOSAGEM PROTEICA	7
4.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE C-75	8
4.2.4 TITULAÇÃO DA FRAÇÃO C-75	8
4.3 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75	8
4.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q	8
4.3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO S	9
4.3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO	9
4.3.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA C18	10

4.3.5	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA PEPTIDE C18	10
4.4	AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA FRAÇÃO PURIFICADA	10
5	RESULTADOS	12
5.1	DOSAGEM PROTEICA DO EXTRATO BRUTO C-75	12
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E TITULAÇÃO DA FRAÇÃO C-75	12
5.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q	12
5.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO S	12
5.5	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO	17
5.6	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA C18	17
5.7	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA PEPTIDE C18	17
5.8	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	17
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	33
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Massa molecular, tempo de retenção e porcentagem de acetonitrila das frações C3 a C13 provenientes da cromatografia de fase reversa em coluna C18. 20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão de atividade antagonista pelo extrato intracelular da cultura de *Shigella sonnei* SS9 precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) contra a amostra *Shigella sonnei* SS12 e determinação do título de atividade inibitória. Título superior a 838.860.800 unidades arbitrárias de atividade antibacteriana/mL. 13

Figura 2: Cromatografia de troca iônica da fração intracelular da cultura de *Shigella sonnei* SS9 precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) em coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™ (GE Healthcare) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, leitura em Abs = 280 nm. 14

Figura 3: Expressão de atividade antagonista pelas frações provenientes da cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q do extrato intracelular da cultura de *Shigella sonnei* SS9 precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) contra a amostra *Shigella sonnei* SS12. 15

Figura 4: Cromatografia de troca iônica do *pool* das frações 1 e 2 provenientes da cromatografia em coluna aniônica (Mono Q). Coluna Mono S™ 5/50 GL Tricorn™ (GE Healthcare) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,02 M, pH5,0 eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹, leitura em Abs = 280nm. 16

Figura 5: Cromatografia de gel filtração do *pool* das frações 1 e 2 provenientes da cromatografia em coluna Mono Q. Coluna de exclusão molecular HR 10/30 Superose 12 (Pharmacia Biotech), fluxo de 0,5 mL min⁻¹, fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, detecção do eluato monitorada em Abs = 280 nm. 18

Figura 6: Cromatografia de fase reversa em coluna Discovery[®] C18 5 µm (250 x 4,6 mm) (Supelco Analytical) do *pool* das frações 9 e 10 provenientes da cromatografia de gel filtração. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída em solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de TFA 0,05% v/v em água Milli Q[®]) perfazendo o seguinte gradiente (linha verde): 0-10min (solução A 100%); 10-40 min (solução B de 0 a 100%); de 40-50 min (solução B 100%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (linha azul) e 220 nm (linha vermelha). 19

Figura 7: Cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil[™] Peptide C18 5µm ST (150 x 4,6 mm) (Pharmacia Biotech) da fração 6 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída em solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de TFA 0,05% v/v em água Milli Q[®]) perfazendo o seguinte gradiente (linha verde): 0-10min (solução A 100%); 10-40 min (solução B de 0 a 100%); de 40-50 min (solução B 100%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (linha azul) e 220 nm (linha vermelha). 21

Figura 8: Espectrometria de massa da fração C3 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 22

Figura 9: Espectrometria de massa da fração C4 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 23

Figura 10: Espectrometria de massa da fração C5 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 24

Figura 11: Espectrometria de massa da fração C6 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 25

Figura 12: Espectrometria de massa da fração C7 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 26

Figura 13: Espectrometria de massa da fração C8 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 27

Figura 14: Espectrometria de massa da fração C9 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 28

Figura 15: Espectrometria de massa da fração C10 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 29

Figura 16: Espectrometria de massa da fração C11 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 30

Figura 17: Espectrometria de massa da fração C12 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração. 31

RESUMO

O gênero *Shigella* é responsável pela disenteria bacilar ou shigelose, forma grave de diarreia inflamatória associada a taxas elevadas de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças com idade inferior a cinco anos. Entre as espécies do gênero, *S. sonnei* predomina em locais mais desenvolvidos, enquanto *S. flexneri* é mais frequentemente observada em regiões menos desenvolvidas. Algumas bactérias, inclusive *Shigella*, são capazes de produzir substâncias de natureza proteica ativas, especialmente, contra amostras filogeneticamente relacionadas, denominadas bacteriocinas. A substância confere vantagem ao organismo que a produz, contribuindo na competição contra amostras que compartilham o mesmo *habitat*. Estudos prévios relataram a síntese de bacteriocinas por amostras de *S. sonnei* isoladas de espécimes fecais de crianças com diarreia aguda em Belo Horizonte. O objetivo desta investigação inclui a extração, a purificação e a caracterização parcial de substância antagonista tipo bacteriocina produzida por *S. sonnei*. A amostra de *S. sonnei* SS9 foi submetida a precipitação proteica com sulfato de amônio e o extrato intracelular precipitado com 75% do sal foi purificado por meio de etapas sequenciais de cromatografia líquida - troca iônica, gel filtração e fase reversa. As frações provenientes da última etapa de purificação foram analisadas por espectrometria de massa, sendo detectadas substâncias com diversas massas moleculares, variando de 5 a 10 kDa, o que sugere a possibilidade de que a(s) substância(s) antagonista(s) seja(m) microcina(s).

Palavras-chave: bacteriocina, *Shigella sonnei*, substância antagonista.

ABSTRACT

Shigella is associated with the etiopathogenesis of shigellosis a severe type of inflammatory diarrhea responsible for high morbidity and mortality rates mainly among children aged less than five years. While *S. sonnei* is the predominant species in developed areas *S. flexneri* is frequently found in underdeveloped regions. Several bacteria are able to produce bacteriocins proteinaceous substances that exhibit activity especially against taxonomically related strains. Bacteriocin production seems to represent a competitive advantage against organisms that share the same habitat. The production of bacteriocins by *S. sonnei* strains isolated from fecal specimens of children with diarrhea in Belo Horizonte has already been reported. We aimed to extract, purify, and partially characterize antagonistic substance(s) synthesized by a *S. sonnei* isolate. Following protein precipitation by employing ammonium sulfate the intracellular fraction obtained at 75% salt saturation was submitted to purification by sequential steps of liquid chromatography – ionic exchange, gel filtration, and reverse phase. Fractions collected from the last purification step were submitted to mass spectrometry. Substances with several molecular masses ranging from 5 to 10 kDa were detected, suggesting the possibility that antagonistic substance(s) should be microcin(s).

Key-words: bacteriocin, *Shigella sonnei*, antagonistic substance

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Shigella* E ENTERITE AGUDA

O gênero *Shigella*, incluído na família Enterobacteriaceae, é constituído por bastonetes Gram negativos, imóveis, anaeróbios facultativos e capazes de fermentar a glicose. São reconhecidas quatro espécies de *Shigella*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. sonnei*, que incluem 18, 13, 15 e um sorotipo, respectivamente (Niyogi, 2005).

O microrganismo é agente da shigelose ou disenteria bacilar, quadro de enterite aguda associado a taxas elevadas de morbidade e mortalidade entre crianças menores de cinco anos (Farshad *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2010). Estimativas indicam a ocorrência anual de 150 milhões de casos da doença, responsáveis por aproximadamente um milhão de óbitos, em particular em países em desenvolvimento (Parsot, 2005).

S. sonnei está associada a cerca de 77% dos casos de shigelose nas regiões desenvolvidas, que dispõem de tratamento de água e saneamento básico adequados. Já nos países menos desenvolvidos, observa-se predomínio de *S. flexneri*, seguida por *S. sonnei* (Talukder, 2006; Madiyarov *et al.*, 2010). A doença é altamente contagiosa, com dose infectante de 10 a 100 células bacterianas. A contaminação se dá, via de regra, pela rota fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados (Farshad *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2010).

Após ter acesso ao hospedeiro, o microrganismo enfrenta os diversos mecanismos de defesa expressos pelo mesmo, barreiras físicas, químicas e biológicas, atingindo, então, seu órgão alvo. No intestino grosso, desencadeia a shigelose, doença caracterizada pela destruição das células epiteliais do cólon, em decorrência da resposta inflamatória com presença de abscessos e ulcerações, induzida pela invasão da mucosa pelas células bacterianas (Parsot, 2005). O processo envolve várias etapas, incluindo macropinocitose e escape para o citoplasma, seguido por multiplicação e passagem para as células adjacentes e células epiteliais mais profundas (Jennison & Verma, 2004; Niyogi, 2005). *Shigella* invade a mucosa intestinal através das células M e, a seguir, a bactéria penetra nos enterócitos pela superfície basolateral dos mesmos e se dissemina lateralmente pela linha epitelial. O microrganismo alberga um plasmídeo de 230 kDa responsável pela invasão (Bando *et al.*, 2010).

No decorrer da instalação e desenvolvimento da doença, são observados sinais e sintomas que variam de diarreia moderada a disenteria grave e manifestações extraintestinais como febre, vômito, desconforto abdominal e náuseas. Em alguns casos, podem ocorrer complicações neurológicas, como cefaleia, letargia, confusão mental, rigidez na nuca e alucinações (Angelini *et al.*, 2009).

A shigelose é um quadro, habitualmente, autolimitado. Entretanto, o emprego de agentes antimicrobianos para tratamento de pacientes com disenteria reduz a duração da doença, a taxa de mortalidade associada a ela e o período de excreção da bactéria. Tem sido observada elevação das taxas de resistência a drogas entre amostras de *Shigella*, decorrente do uso inadequado das mesmas, o que tem acarretado redução da eficácia da terapia antimicrobiana. Um dos mecanismos de desenvolvimento de resistência é a transferência horizontal de fatores genéticos, especialmente plasmídeos R, transposons e integrons (Madiyarov *et al.*, 2010).

1.2 BACTERIOCINAS

Bacteriocinas são substâncias antagonistas de natureza proteica sintetizadas por uma ampla gama de bactérias, tanto Gram positivas como Gram negativas. As bacteriocinas conferem vantagem ao organismo produtor, pois ao serem sintetizadas e liberadas, podem eliminar espécies competidoras presentes no mesmo habitat contribuindo, em última análise, para uma maior disponibilidade de nutrientes e espaço (Zhang, *et al.*, 2008).

Além do papel relevante que as bacteriocinas desempenham na ecologia microbiana, as substâncias são apontadas como possíveis substitutas aos antibióticos tradicionais e vêm sendo utilizadas na indústria alimentícia, para conservação de alimentos. Organismos produtores de bacteriocinas podem, ainda, ser empregados como probióticos (Jeziorowski & Gordon, 2007; Belguesmia, *et al.*; 2010; Šmajs, *et al.*; 2010).

Diversas bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas, especialmente *Escherichia coli*, já foram caracterizadas. Estas substâncias agem, especialmente, sobre bactérias taxonomicamente relacionadas, mas não atuam sobre as células produtoras, que expressam mecanismos de imunidade contra sua própria bacteriocina. Na maioria das vezes, são codificadas por genes plasmidiais (Chavan *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2006; Cascales, 2007; Line *et al.*, 2008, Sousa, *et al.*; 2010).

As bacteriocinas sintetizadas por enterobactérias podem ser classificadas como colicinas, com peso molecular variando entre 25 e 80 kDa, e microcinas, que possuem peso molecular inferior a 10 kDa. As microcinas podem ser divididas em classe I, com tamanho menor que 5 kDa, e classe II, com peso molecular entre 7 a 10 kDa (Dirix *et al.*, 2004).

No que se refere a colicinas, a interação entre as mesmas e bactérias suscetíveis acontece da seguinte maneira: a substância liga-se a receptores específicos na superfície celular, sendo, então, translocada até a membrana citoplasmática ou o citoplasma e, finalmente, levando a alterações metabólicas na célula alvo (Chavan, *et al.*; 2005, Zhang, *et al.*, 2008). Estudos demonstram uma variedade de mecanismos de ação de colicinas. Assim, as alterações desencadeadas pelas mesmas incluem formação de poros na membrana citoplasmática, inibição da síntese de peptidoglicano, inibição da síntese proteica pela clivagem do RNA ribossômico 16S ou RNA transportador e degradação do DNA (Cascales *et al.*, 2007).

A produção de bacteriocinas já foi descrita para *S. sonnei*, *S. flexneri* e *S. boydii* (Amako *et al.*, 1978; Dhillon *et al.*, 1982; Smarda *et al.*, 1987; Horák, 1994; Smajs *et al.*, 1997; Tigyi *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2006). Entretanto, estudos que objetivam a caracterização mais detalhada destas substâncias são escassos.

Para melhor compreensão do papel das bacteriocinas nas relações ecológicas entre bactérias, ensaios visando à avaliação das condições ideais para expressão da atividade antagonista e referentes à produção da substância *in vitro*, seguidos por etapas de extração, purificação e caracterização são fundamentais. Além de promover o conhecimento básico relativo ao tema, estudos com esta abordagem devem, obrigatoriamente, preceder qualquer proposta de aplicação prática destas substâncias. Uma abordagem comumente empregada inclui extração proteica por precipitação com sulfato de amônio seguida por etapas sucessivas de cromatografia. Realiza-se a avaliação da atividade após cada uma das etapas e, após obtenção da substância purificada, a mesma é caracterizada no que se refere a determinação da massa molecular e sequência de aminoácidos (Apolônio *et al.*, 2007; Ribeiro-Ribas *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Os membros da família Enterobacteriaceae são bastonetes Gram negativos, que fazem parte da microbiota indígena da maioria dos animais, incluindo os seres humanos. Alguns destes organismos são agentes de doenças infecciosas, entre as quais merecem menção enterite infecciosa aguda e infecção do trato urinário. Destacam-se, como importantes membros desta família, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Yersinia*.

O gênero *Shigella*, que inclui as espécies *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*, é responsável pela disenteria bacilar ou shigelose, quadro associado a taxas elevadas de morbidade e mortalidade, principalmente em países menos desenvolvidos. A doença é endêmica, prevalente em todo o mundo e acomete, com maior frequência, crianças com até cinco anos de idade. A transmissão ocorre, via de regra, pela rota fecal-oral, sendo o agente veiculado por água e alimentos. A dose infectante é baixa, sugerindo desta forma, um eficiente mecanismo de virulência.

Após a contaminação, as bactérias atravessam o tubo digestivo em direção ao intestino grosso, invadem a mucosa do cólon. Os pacientes com shigelose apresentam diarreia inflamatória moderada ou grave, caracterizada pelo desequilíbrio hidroeletrolítico intestinal, com eliminação de fezes em pequeno volume, contendo muco, sangue e pus. Este desequilíbrio contribui para a eliminação do microrganismo, como também para a disseminação do mesmo.

Um importante mecanismo de competição microbiana desenvolvido pelas bactérias, como *Shigella*, é a produção de substâncias antagonistas denominadas bacteriocinas. Estas substâncias possuem fração proteica biologicamente ativa que pode estar associada a lipídeos ou carboidratos. São codificadas, na maioria das vezes, por genes plasmidiais e apresentam atividade bactericida ou bacteriostática predominantemente contra espécies filogeneticamente relacionadas.

Tendo em vista que a shigelose é um problema de saúde pública que afeta o mundo inteiro, que *S. sonnei* é um dos principais agentes etiológicos da doença, que a bactéria é capaz de produzir bacteriocinas, que estas substâncias podem desempenhar papel relevante na virulência do microrganismo e que dados referentes ao assunto na literatura especializada são escassos, desenvolvemos este estudo, visando contribuir para o conhecimento do tema.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Extrair, purificar e caracterizar parcialmente uma substância antagonista produzida por *S. sonnei*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a expressão de antagonismo *in vitro* por uma amostra de *S. sonnei*.
- Extrair e purificar uma substância antagonista produzida pela amostra de *S. sonnei*.
- Determinar a massa molecular da substância antagonista purificada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo faz parte de um projeto mais abrangente, que vem sendo desenvolvido pelas equipes do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina e do Grupo de Trabalho Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ambos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, todos da UFMG.

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Duas amostras de *S. sonnei*, denominadas SS9 e SS12, foram empregadas neste estudo como produtora de substância antagonista e reveladora da expressão do antagonismo, respectivamente. Estas amostras pertencem à bacterioteca do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas/PRO/FM/UFMG e foram isoladas de espécimes fecais de crianças com diarreia aguda atendidas no Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG e em Teresina/ PI: estudo clínico e laboratorial”. As amostras vêm sendo mantidas em Brucella Broth¹ acrescido de glicerol 10% em freezer -80°C.

A amostra SS9 foi selecionada entre nove amostras da espécie capazes de produzir substâncias antagonistas por apresentar os halos de inibição das amostras reveladoras maiores e mais lípidos. SS12 foi escolhida aleatoriamente entre sete amostras de *S. sonnei* que apresentaram sensibilidade à atividade antagonista expressa por todas as amostras produtoras (Sousa *et al.*, 2010).

4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO INTRACELULAR

A amostra SS9 criopreservada foi submetida a três repiques consecutivos em Tryptic Soy Agar (TSA)² e a cultura foi incubada a 37°C, em atmosfera de aerobiose, por 24 h.

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Difco, Sparks, MD, EUA

Colônias obtidas do terceiro repique foram cultivadas em 20 mL de Tryptic Soy Broth (TSB)³ e, após incubação nas mesmas condições descritas acima, a cultura bacteriana foi vertida em 580 mL de TSB. Após 12 h de incubação, o material foi centrifugado a 16.200 x g, a 4°C, por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, centrifugado e ressuspensionado em 15 mL do mesmo tampão. A suspensão foi sonicada a 50 W, por 12 ciclos de 1 min, com intervalos de 30 s, em banho de gelo. Para comprovação da lise celular total, uma alíquota da suspensão sonicada foi submetida à coloração pelo método de Gram e o esfregaço foi examinado em microscópio óptico. A suspensão foi centrifugada a 4°C, por 30 min, a 16.200 x g e o sobrenadante foi mantido em banho de gelo e submetido à precipitação proteica por meio de adição lenta e constante de sulfato de amônio em duas concentrações, 0-30 e 30-75% p/v, sob leve agitação. Após centrifugação a 4°C, por 30 min, a 29.829 x g, os precipitados foram ressuspensionados em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2. Desta forma, foram obtidas as frações intracelulares C-30 e C-75. Com base em resultados prévios (Sousa, 2010), a fração C-75 foi selecionada para o estudo.

4.2.1 DIÁLISE DO EXTRATO PROTEICO

O extrato C-75 foi transferido para membrana com limite de exclusão de 12-16 kDa⁴ e submetido a diálise contra dois litros de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, em câmara fria a 4°C, por 24 h, realizando-se três trocas de tampão neste intervalo de tempo. O volume do extrato foi medido e, em seguida, o mesmo foi filtrado em membrana com poro de 0,45 µm⁵, aliquotado em tubos de microcentrífuga e armazenado a -80°C.

4.2.2 DOSAGEM PROTEICA

A dosagem proteica da fração intracelular C-75 foi realizada segundo metodologia descrita por Bradford (1976), que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 como ligante às proteínas presentes na amostra, desenvolvendo uma reação de cor. A soroalbumina bovina foi utilizada como padrão.

³ Difco

⁴ Viskase, Darien, IL, EUA

⁵ Corning, Lowell, MA, EUA

4.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE C-75

Uma alíquota de 10 µL da fração C-75 foi gotejada sobre a superfície de uma placa de TSA. A placa foi exposta a vapor de clorofórmio por 30 min e, após evaporação do clorofórmio residual, a camada de TSA foi recoberta com 3,5 mL de TSA semi-sólido (TSB + 0,7% de ágar) acrescido de 10 µL de cultura da amostra reveladora em TSB. Após incubação a 37°C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose, a leitura foi realizada pela verificação da presença ou ausência de halos de inibição da multiplicação da amostra reveladora. Como controle, foi empregado Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, tampão utilizado para a diluição da fração C-75.

4.2.4 TITULAÇÃO DA FRAÇÃO C-75

O extrato C-75 foi submetido a diluições seriadas em água Milli-Q^{®6} estéril e 10 µL de cada diluição foram depositados sobre uma placa de TSA. Após exposição a vapor de clorofórmio e evaporação do clorofórmio residual, testes de antagonismo foram realizados conforme descrito em 4.2.3. O título, definido como a recíproca da maior diluição que resultou em um halo límpido de inibição da amostra reveladora, foi determinado. Em seguida, a atividade antibacteriana foi calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA).mL⁻¹, empregando-se a fórmula “UA = título x 1000 µL x v⁻¹(µL)”, sendo v o volume do extrato utilizado no ensaio (Batdorj *et al.*, 2006).

4.3 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75

O extrato proteico C-75 foi purificado por etapas sequenciais de cromatografia líquida, conforme descrito a seguir.

4.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q

O extrato C-75 foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q[™] 5/50 GL Tricorn^{™7} acoplada a sistema *fast protein liquid chromatography* (FPLC). A

⁶ Eppendorf, Molsheim, França

⁷ GE Healthcare, Uppsala, Suécia

coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Para eluição da amostra, foi utilizado o mesmo tampão acrescido de NaCl 1,0 M, em gradiente linear de 0-100%. Frações de 1,5 mL foram coletadas e liofilizadas (Everse & Stolzenbach, 1971), ressuspensas em água Milli-Q[®] estéril e testadas para avaliação da atividade antagonista. As frações ativas foram submetidas a dosagem proteica e titulação, conforme descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.4, respectivamente.

4.3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO S

O *pool* das duas frações obtidas da cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q que geraram os maiores halos de inibição da amostra reveladora foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 12-16 kDa contra tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,0, a 4°C, por 24 h. Após diálise, o material foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna Mono STM 5/50 GL Tricorn^{TM8} acoplada a sistema FPLC. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado na diálise com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Para a eluição da amostra, foi utilizado o mesmo tampão acrescido de NaCl 1,0 M, em gradiente linear de 0-100%, sendo coletadas frações de 1,5 mL.

4.3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO

As duas frações obtidas da cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q que geraram os maiores halos de inibição da amostra reveladora foram misturadas e o *pool* gerado foi submetido a cromatografia em coluna de exclusão molecular HR 10/30 Superose 12⁹ acoplada a sistema FPLC. Como fase móvel, foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, sendo coletadas frações de 1,5 mL, que foram monitoradas a 280 nm. Todo o ensaio cromatográfico foi realizado à temperatura de aproximadamente 25°C. As frações foram liofilizadas, ressuspensas em água Milli-Q[®] e testadas quanto à expressão de antagonismo. As frações ativas foram submetidas a dosagem proteica e titulação, como previamente descrito (itens 4.2.2 e 4.2.4, respectivamente).

⁸ GE Healthcare

⁹ Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA

4.3.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA C18

Duas frações ativas selecionadas entre aquelas provenientes da cromatografia de gel filtração com base no perfil cromatográfico foram utilizadas para confecção de um *pool* e o mesmo foi analisado em coluna Discovery[®] C18 5 µm (250 x 4,6 mm)¹⁰ acoplada a sistema *high-performance liquid chromatography* (HPLC). A coluna foi previamente lavada com solução B (acetonitrila¹¹ 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA)¹² 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]). As frações foram eluídas com as soluções A e B, mantendo-se um fluxo de 60 mL.h⁻¹, perfazendo-se um gradiente linear de 0 a 100%, utilizando o seguinte programa: 0-10min 100% da solução A, 10-40min 0-100% da solução B e 40-50min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 280 nm, com temperatura aproximada de 25°C. As frações foram coletadas, liofilizadas e ressuspendidas. As frações ativas foram submetidas a análise por espectrometria de massa.

4.3.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA PEPTIDE C18

Uma fração selecionada entre aquelas geradas pela cromatografia de fase reversa em coluna C18 foi submetida a cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil[™] Peptide C18 5µm ST¹³ (150 x 4,6 mm) acoplada a sistema HPLC, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.3.4.

4.4 AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA FRAÇÃO PURIFICADA

Frações provenientes das etapas de cromatografia de fase reversa (colunas C18 e Peptide C18) foram solubilizadas em solução de TFA 0,1% e adicionadas em uma matriz de alfa-ciano-4-hidroxicinâmico na proporção de 1:1. Foi depositado 0,5 µL/poço, em duplicata, em uma placa de aquisição de dados do MALDI (MTP AnchorChips 384 x 600)¹⁴ que foi mantida à temperatura ambiente. Para determinação das massas moleculares, empregou-se o Autoflex[®] III MALDI-TOF/TOF¹⁵ operado no modo linear positivo. Para a

¹⁰ Supelco Analytical, Bellefonte, PA, EUA

¹¹ Merck, Rahway, NJ, EUA

¹² Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

¹³ Pharmacia Biotech

¹⁴ Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

¹⁵ Bruker Daltonics

calibração linear foi utilizado o kit de calibração *Protein Calibration Standard II*¹⁶ e para a análise dos dados foi empregado o programa *Flex Analysis*¹⁷.

A análise por espectrometria de massa foi realizada no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

¹⁶ Bruker Daltonics

¹⁷ Bruker Daltonics

5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM PROTEICA DO EXTRATO BRUTO C-75

Após a extração proteica de cultura da amostra *S. sonnei* SS9 e diálise, obteve-se um volume final de 11,5 mL do extrato bruto C-75. A dosagem proteica do material foi de 15,45 mg.mL⁻¹.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E TITULAÇÃO DA FRAÇÃO C-75

A fração C-75 apresentou atividade inibitória contra a amostra SS12. O título de C-75 foi superior a 838.860.800 UA de atividade antibacteriana.mL⁻¹ (FIG. 1).

5.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q

Foram coletadas 40 frações provenientes da cromatografia em coluna de troca iônica Mono Q, conforme observado no perfil cromatográfico (FIG. 2). Todas as frações coletadas foram ativas contra a amostra reveladora. As frações 1 e 2, correspondentes ao material que não interagiu com a coluna, produziram halos nítidos e maiores que aqueles observados para as demais frações (FIG. 3), sendo selecionadas para avaliação em cromatografia catiônica Mono S. O *pool* das frações 1 e 2, cujo volume foi de 400 µL, apresentou concentração proteica de 61,3 µg. mL⁻¹ e título de atividade antagonista de 1.677.721.600 UA.mL⁻¹.

5.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO S

O *pool* das frações 1 e 2 originadas da etapa prévia de cromatografia de troca iônica também não interagiu com a coluna Mono S, conforme pode ser observado na FIG. 4.

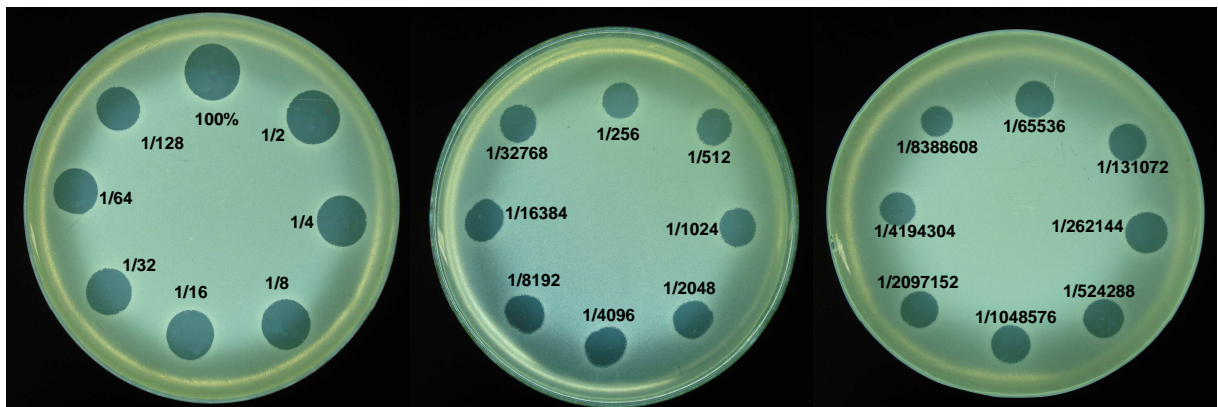


Figura 1

Expressão de atividade antagonista pelo extrato intracelular da cultura de *Shigella sonnei* SS9 precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) contra a amostra *Shigella sonnei* SS12 e determinação do título de atividade inibitória. Título superior a 838.860.800 unidades arbitrárias de atividade antibacteriana/mL.

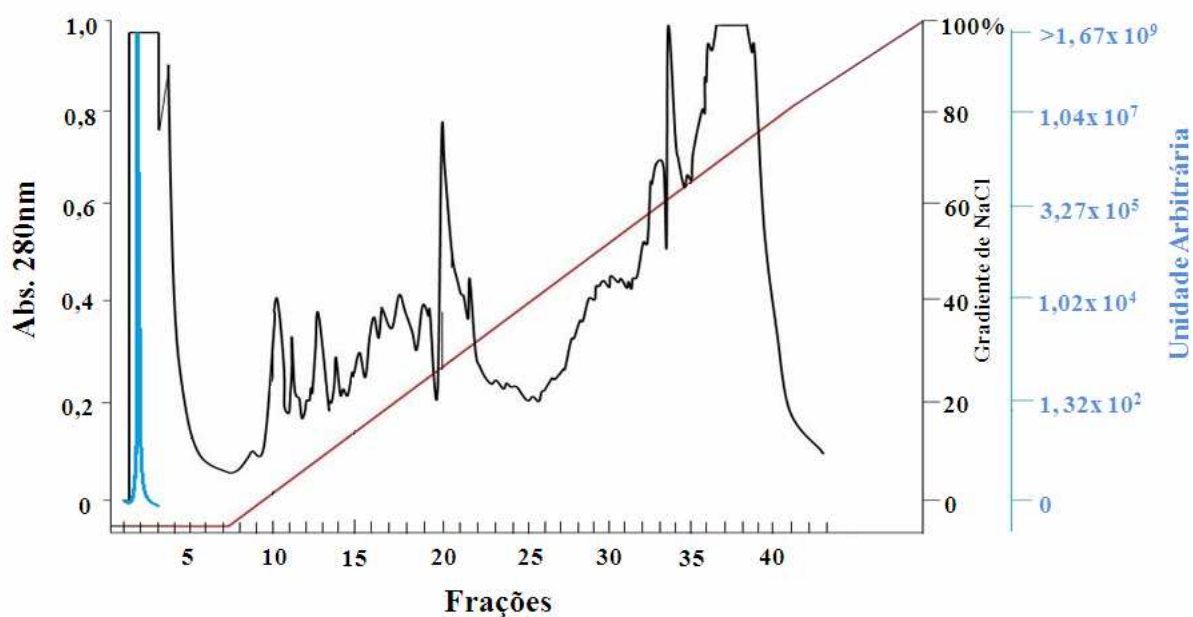


Figura 2

Cromatografia de troca iônica da fração intracelular da cultura de *Shigella sonnei* SS9 precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) em coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™ (GE Healthcare) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão, com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, leitura em Abs = 280 nm.

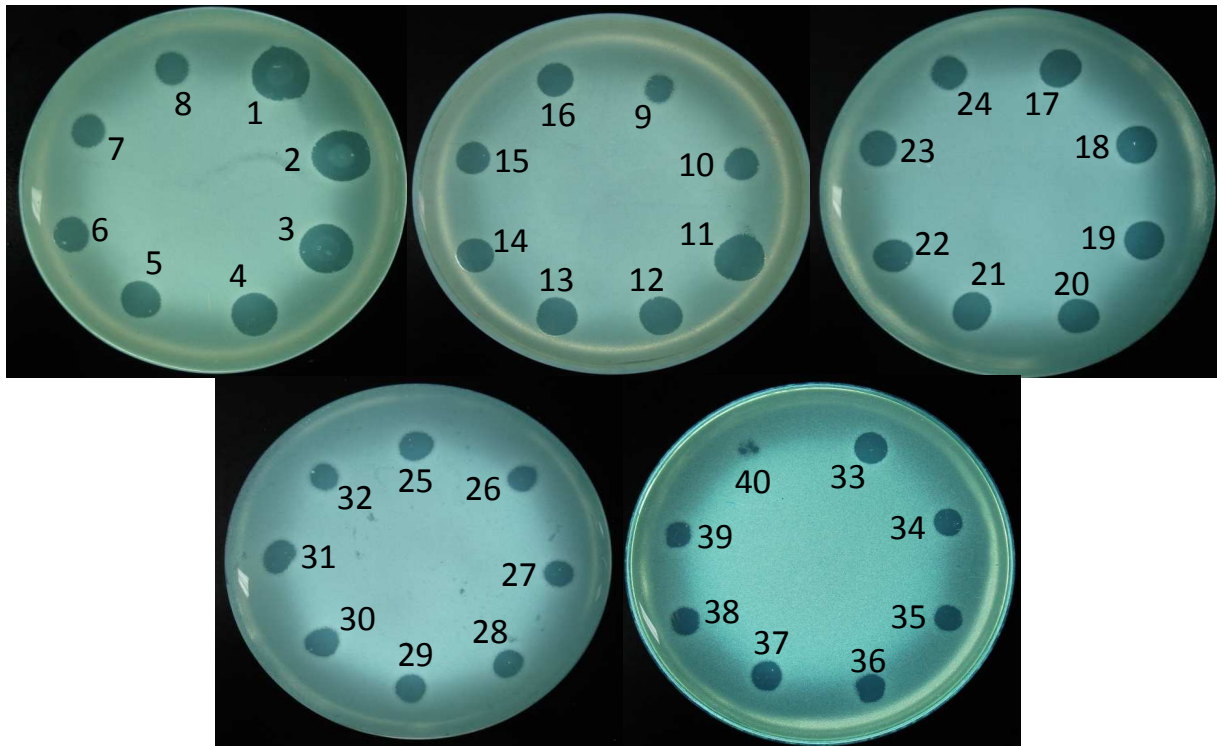


Figura 3

Expressão de atividade antagonista pelas frações provenientes da cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q do extrato intracelular da cultura de *Shigella sonnei* SS9 precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) contra a amostra *Shigella sonnei* SS12.

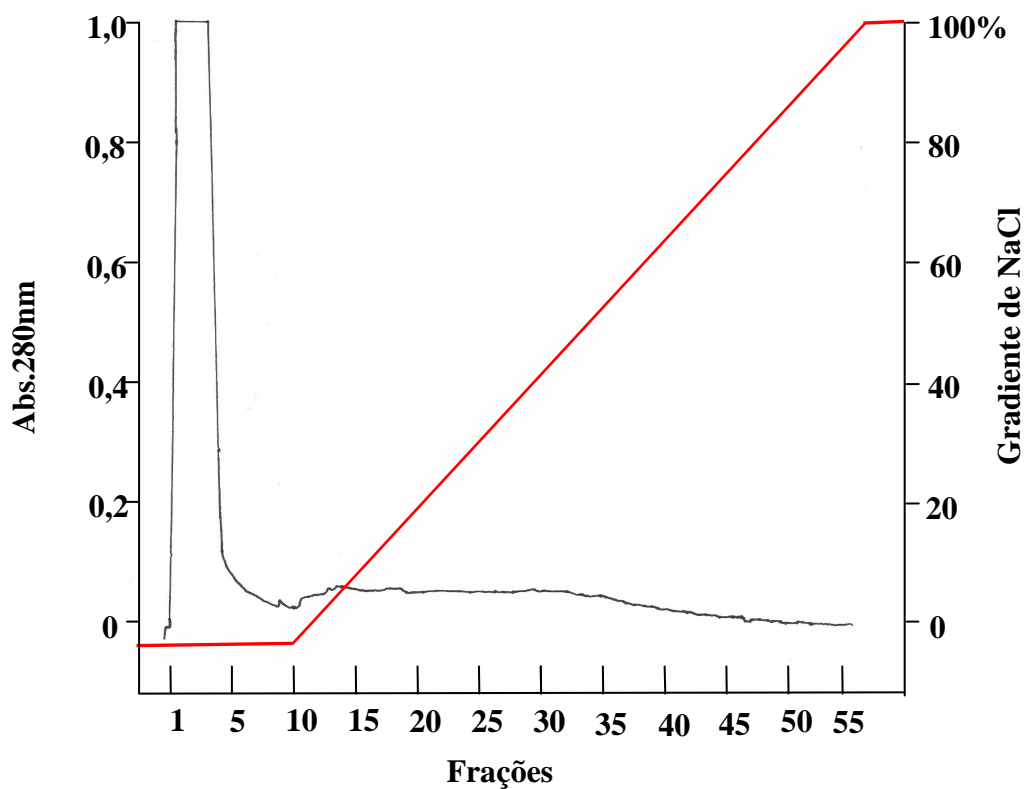


Figura 4

Cromatografia de troca iônica do *pool* das frações 1 e 2 provenientes da cromatografia em coluna aniônica (Mono Q). Coluna Mono STM 5/50 GL TricornTM (GE Healthcare) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,02 M, pH5,0 eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹, leitura em Abs = 280nm.

5.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO

O *pool* das frações 1 e 2 originadas da cromatografia em coluna de troca iônica Mono Q foi submetido a cromatografia em coluna de filtração molecular Superose 12. Foram coletadas 22 frações (FIG. 5), testadas quanto à atividade inibitória contra a amostra SS12. As frações 4 a 10 apresentam halos de inibição límpidos e maiores em relação às outras frações. Entre essas, as frações 9 e 10 geraram pico mais simétrico em relação às demais (FIG. 5), sendo, assim, selecionadas para o estudo. O *pool* das frações 9 e 10 apresentou volume, concentração proteica e título de 200 μL , 25,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 51.200 UA de atividade antagonista. mL^{-1} , respectivamente.

5.6 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA C18

A partir do fracionamento do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração em cromatografia de fase reversa C18 foram obtidas 43 frações (FIG. 6). As frações C3 a C13 apresentaram atividade inibitória contra *S. sonnei* SS12. O tempo de retenção e a porcentagem de eluição em relação à acetonitrila das frações obtidas estão apresentados na TAB. 1.

5.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA PEPTIDE C18

A fração C6 (tempo de retenção 34,03 min, porcentagem de acetonitrila 76%) proveniente da coluna C18, submetida a cromatografia em coluna Peptide C18, originou o perfil cromatográfico apresentado na FIG. 7.

5.8 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os resultados da análise por espectrometria de massa das frações C3 a C13 obtidas a partir da cromatografia de fase reversa C18 estão apresentados nas FIG. 8 a 17 e na TAB. 1.

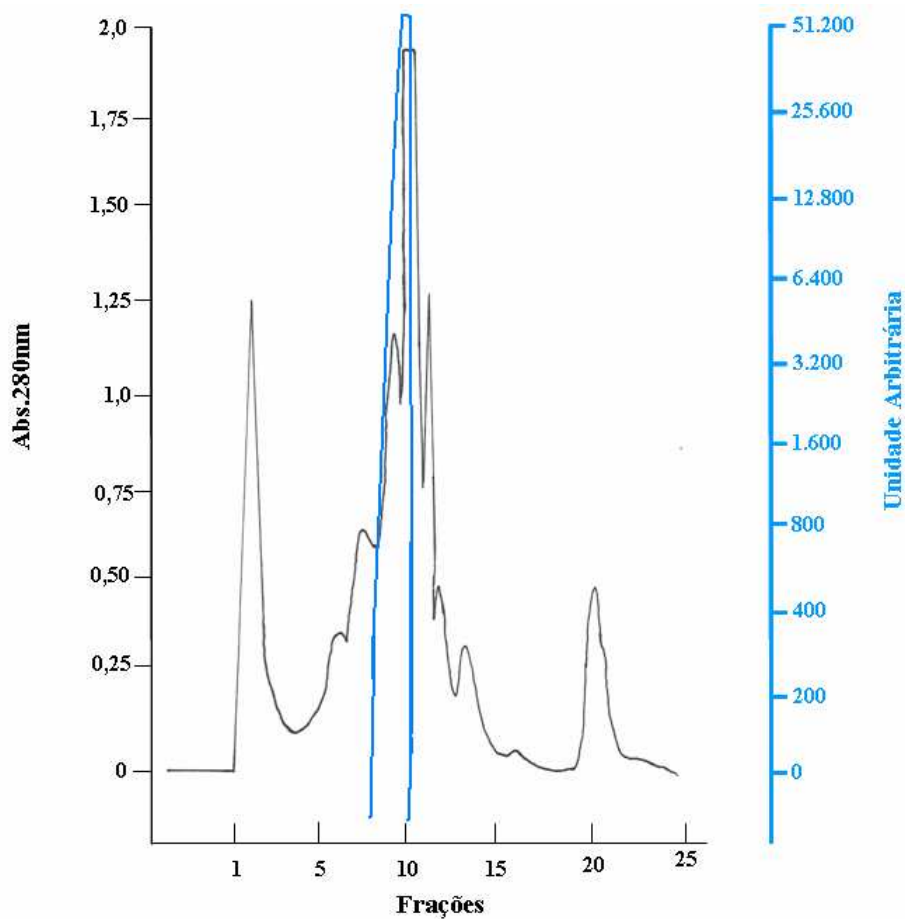


Figura 5

Cromatografia de gel filtração do *pool* das frações 1 e 2 provenientes da cromatografia em coluna Mono Q. Coluna de exclusão molecular HR 10/30 Superose 12 (Pharmacia Biotech), fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, fase móvel tampão Tris-HCl $0,02 \text{ M}$, pH 8,0, detecção do eluato monitorada em $\text{Abs} = 280 \text{ nm}$.

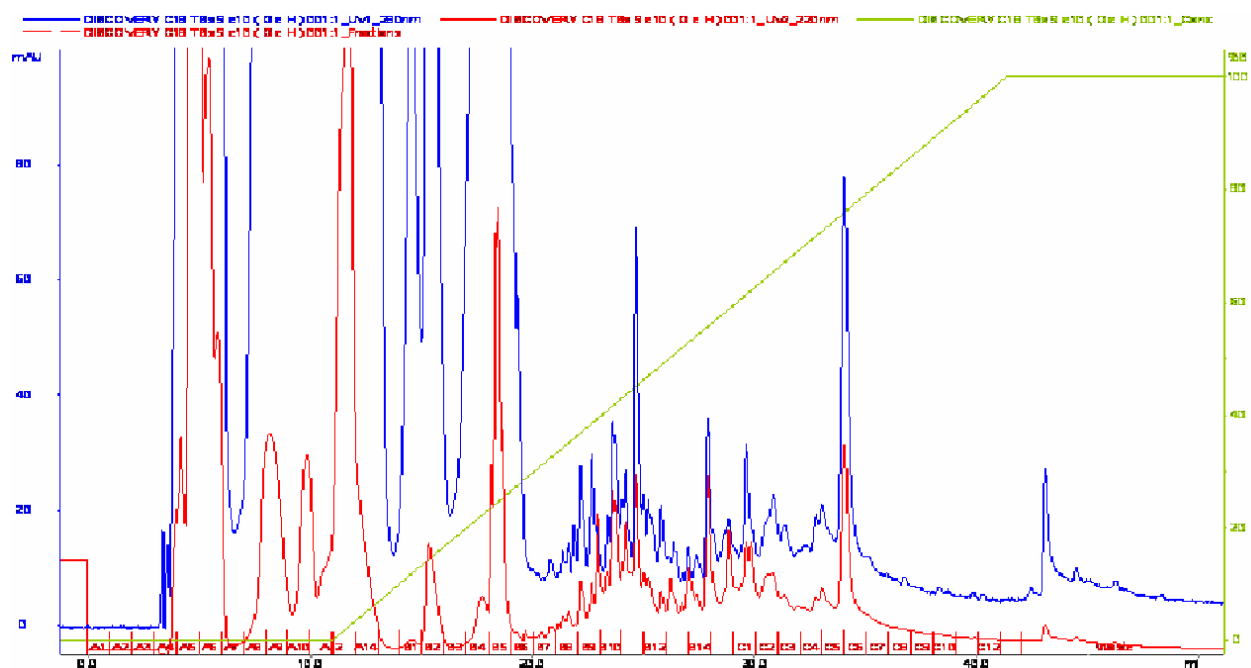


Figura 6

Cromatografia de fase reversa em coluna Discovery[®] C18 5 μ m (250 x 4,6 mm) (Supelco Analytical) do *pool* das frações 9 e 10 provenientes da cromatografia de gel filtração. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída em solução B (acetonitrila 80% v/v acrescida de TFA 0,05% v/v em água Milli Q[®]) perfazendo o seguinte gradiente (linha verde): 0-10min (solução A 100%); 10-40 min (solução B de 0 a 100%); de 40-50 min (solução B 100%). Detecção do eluato monitorada a 280 nm (linha azul) e 220 nm (linha vermelha).

Tabela 1

Massa molecular, tempo de retenção e porcentagem de acetonitrila das frações C3 a C13 provenientes da cromatografia de fase reversa em coluna C18.

Frações	Massas moleculares (Da)	Tempo de retenção (minutos)	Porcentagem de acetonitrila a 80%
C3	5.703,226	31,36	67,02%
	6.407,748		
	7.269,327		
C4	6.252,424	32,76	71,80%
	6.409,460		
	7.269,327		
	7.865,158		
	8.112,752		
C5	5.097,338	33,06	72,80%
	5.520,884		
	6.410,438		
	7.271,672		
	8.114,955		
C6	8.867,779	34,03	76,00%
	10.694,207		
	6.404,813		
	7.267,763		
	8.111,926		
C7	5.098,646	35,15	79,70%
	5.519,069		
	6.253,632		
	6.408,481		
	7.271,672		
C8	7.695,804	36,71	84,80%
	8.114,129		
	8.881,610		
	5.094,505		
	5.518,388		
C9	6.251,216	37,49	87,40%
	6.407,259		
	7.267,763		
	7.693,122		
	7.864,073		
C10	8.112,201	38,30	90,10%
	8.861,443		
	5.097,120		
	5.521,111		
	6.253,390		
C11	6.410,438	39,54	94,20%
	7.273,758		
	7.697,145		
	7.863,260		
	8.117,710		
C12	8.867,203	40,30	96,70%
	5.518,162		
	6.251,941		
	6.406,525		
	7.271,672		
C13	7.865,700	41,17	99,50%
	8.111,099		
	8.450,576		
	A amostra não voou		

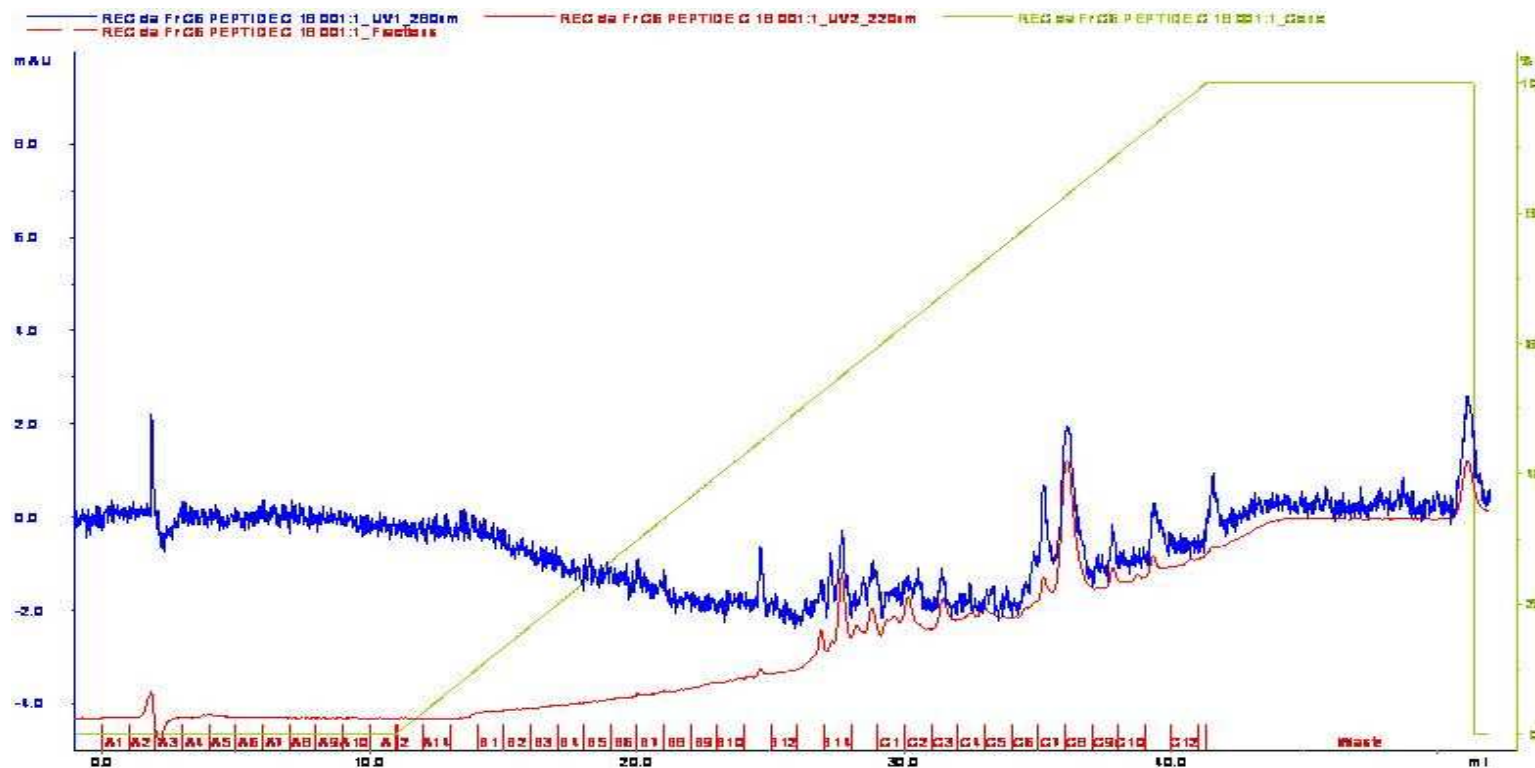


Figura 7

Cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil™ Peptide C18 5µm ST (150 x 4,6 mm) (Pharmacia Biotech) da fração 6 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18. Coluna equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q®) e eluída em solução B (acetoneitrila 100% v/v acrescida de TFA 0,05% v/v em água Milli Q®) perfazendo o seguinte gradiente (linha verde):

0-10min (solução A 100%); 10-40 min (solução B de 0 a 100%); de 40-50 min (solução B 100%).

Deteção do eluato monitorada a 280 nm (linha azul) e 220 nm (linha vermelha).

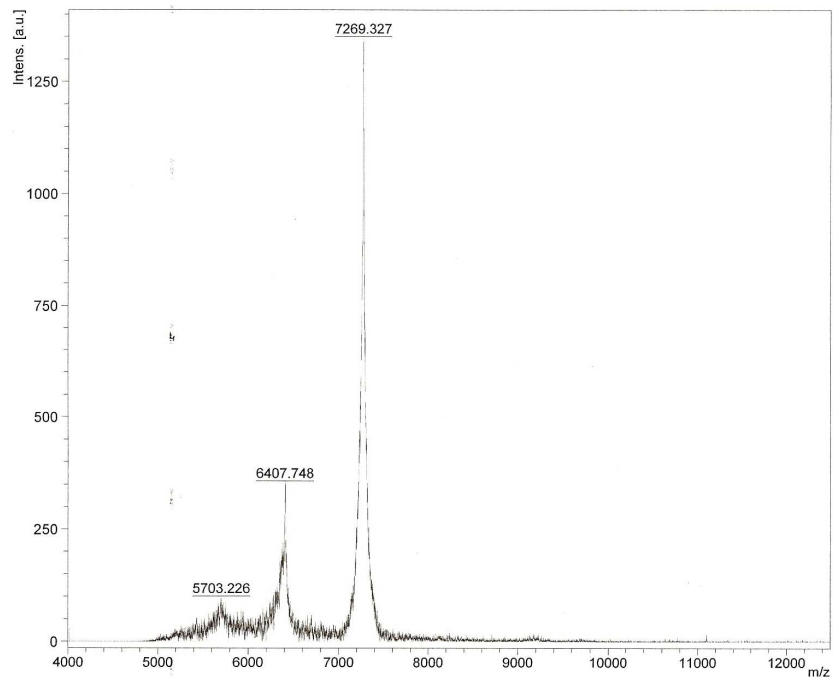


Figura 8

Espectrometria de massa da fração C3 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

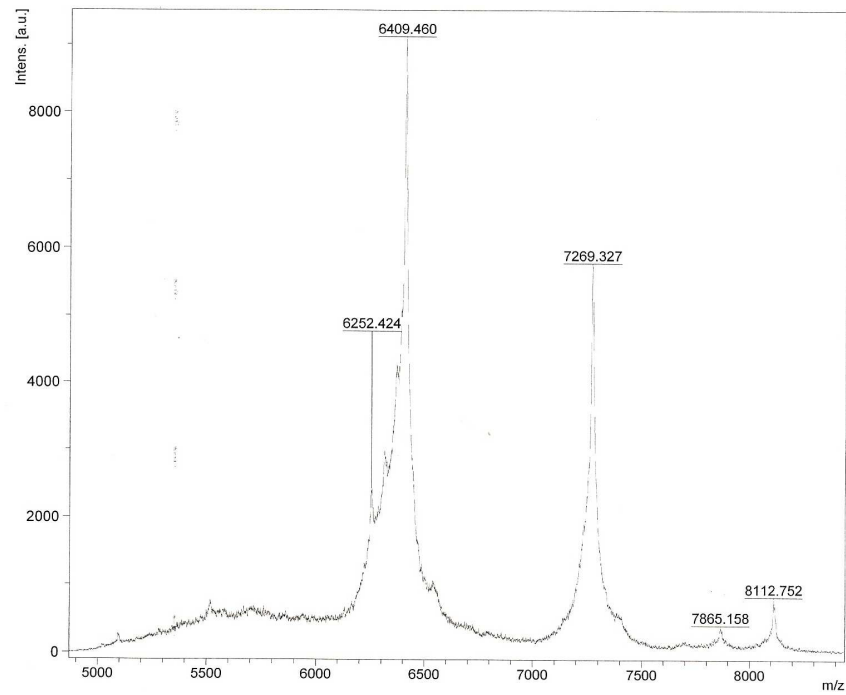


Figura 9

Espectrometria de massa da fração C4 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

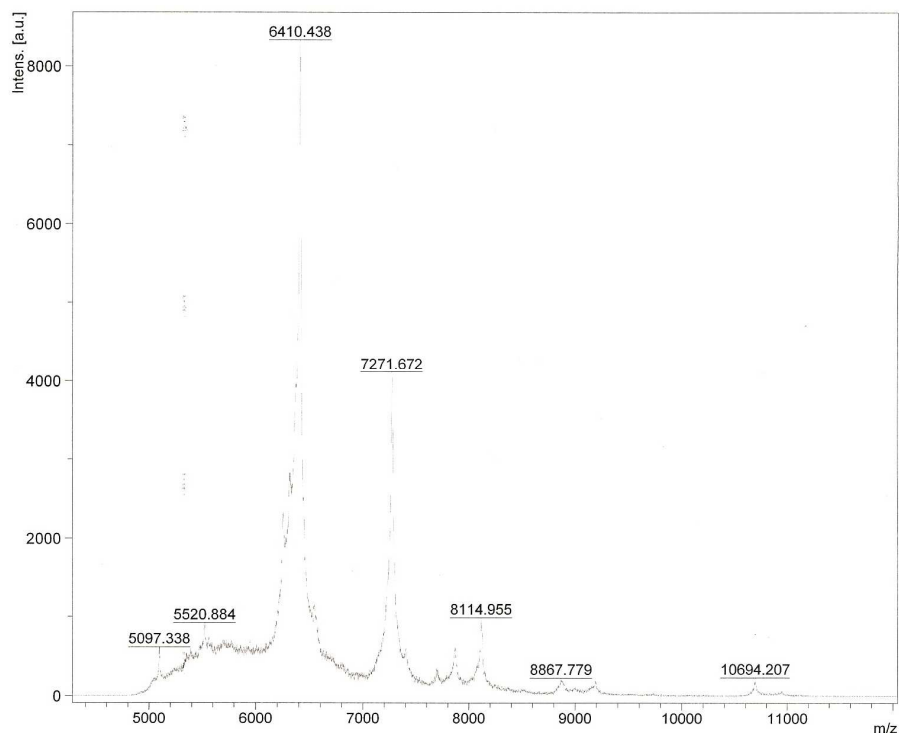


Figura 10

Espectrometria de massa da fração C5 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

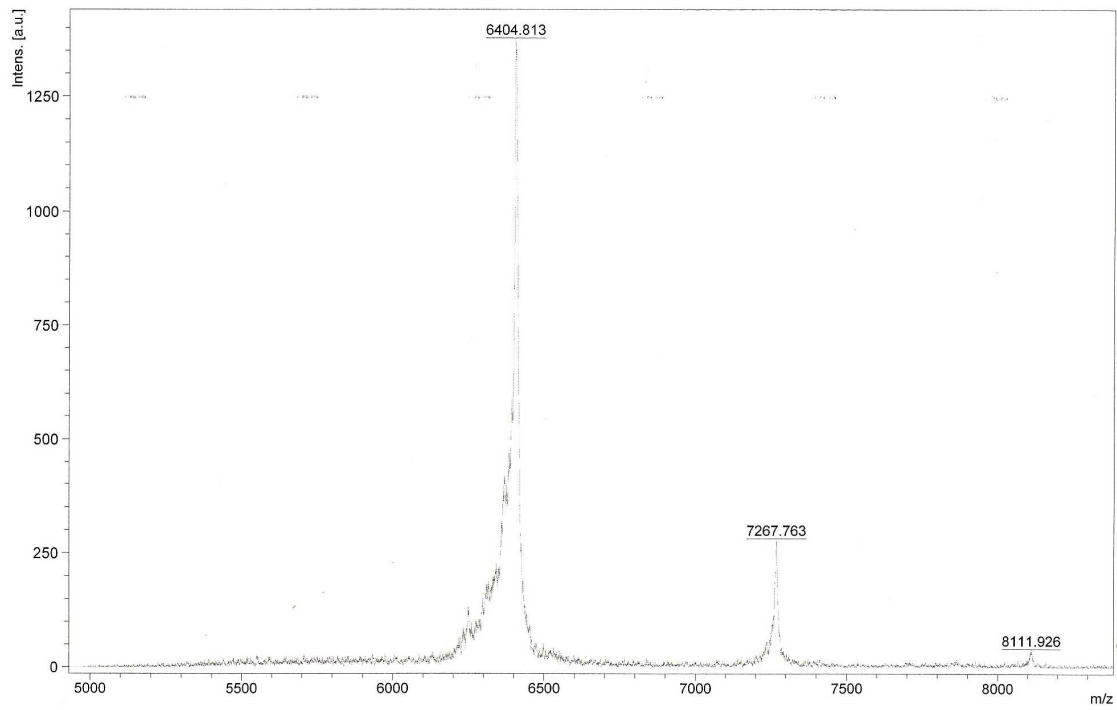


Figura 11

Espectrometria de massa da fração C6 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

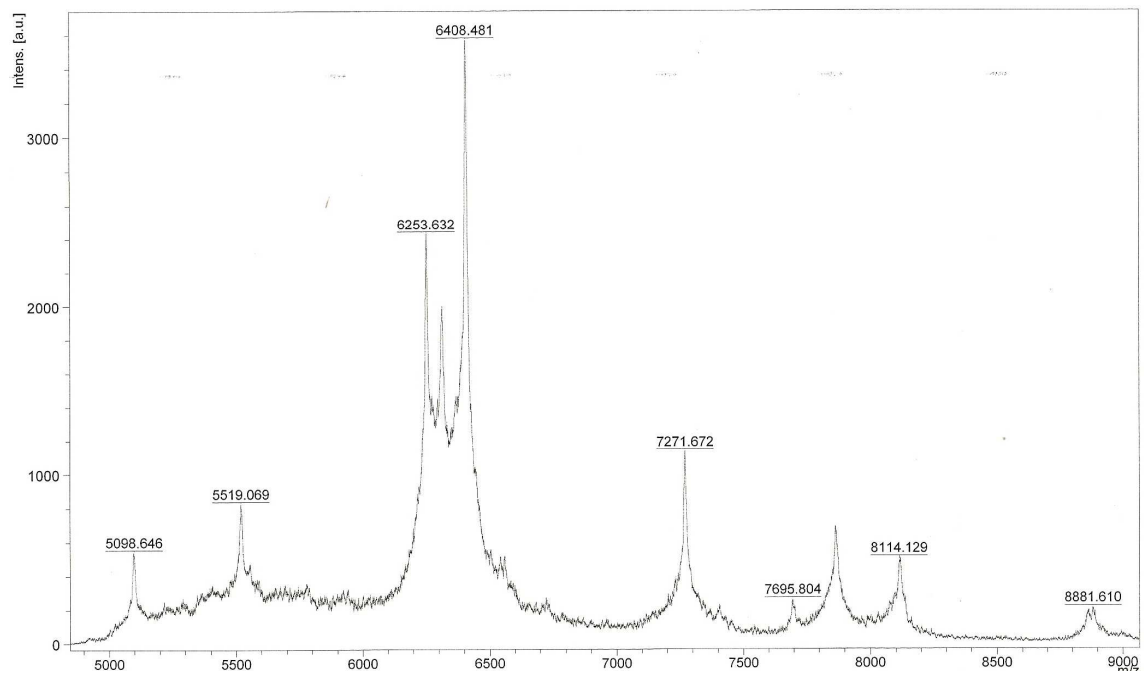


Figura 12

Espectrometria de massa da fração C7 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

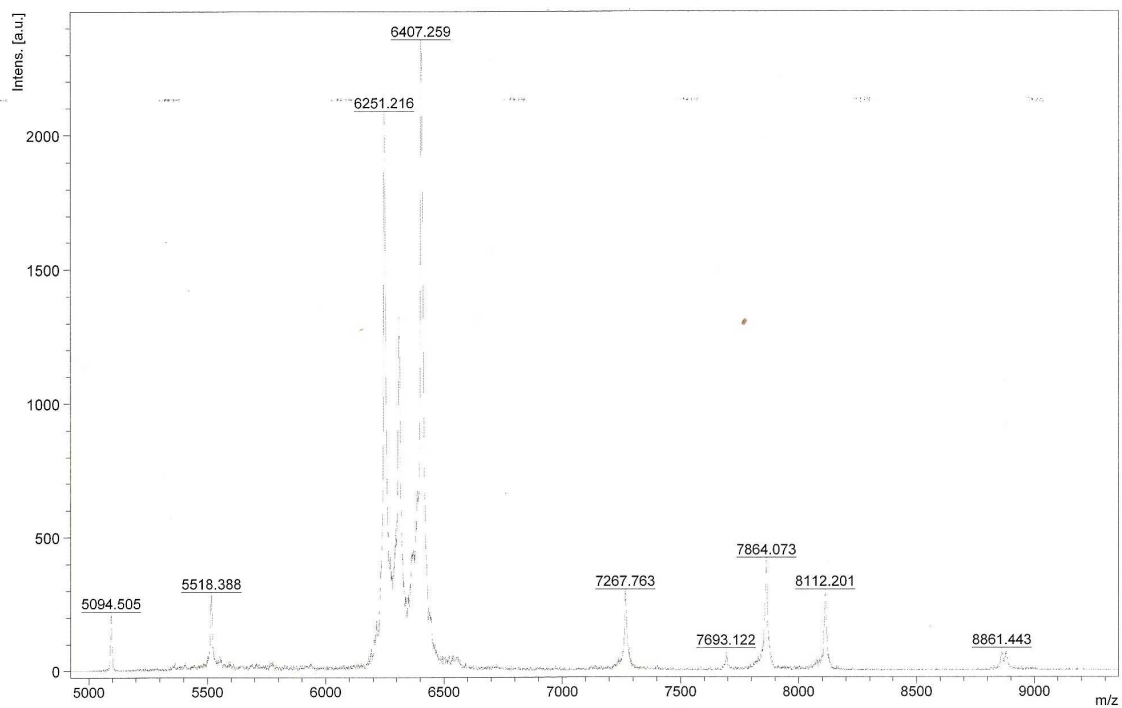


Figura 13

Espectrometria de massa da fração C8 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

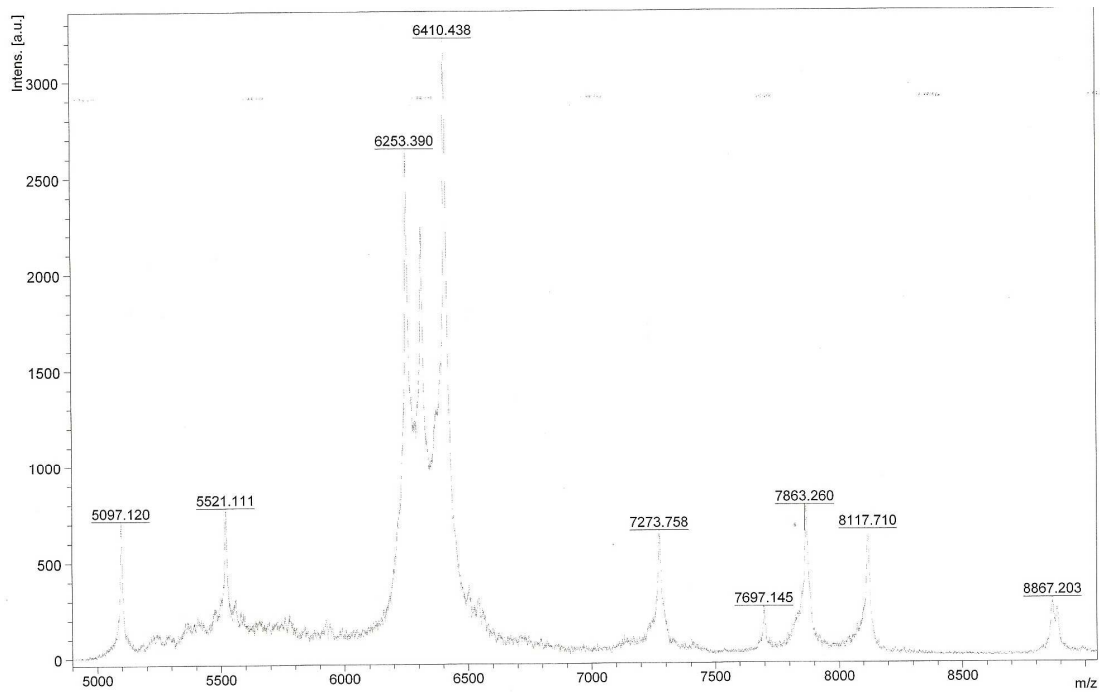


Figura 14

Espectrometria de massa da fração C9 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

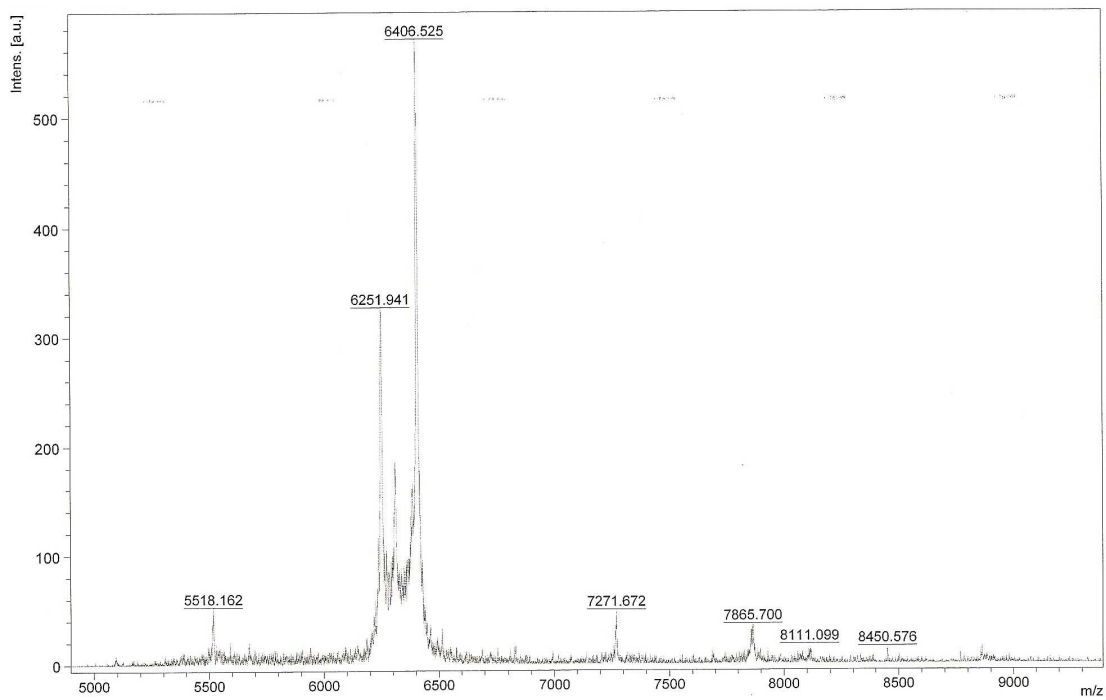


Figura 15

Espectrometria de massa da fração C10 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

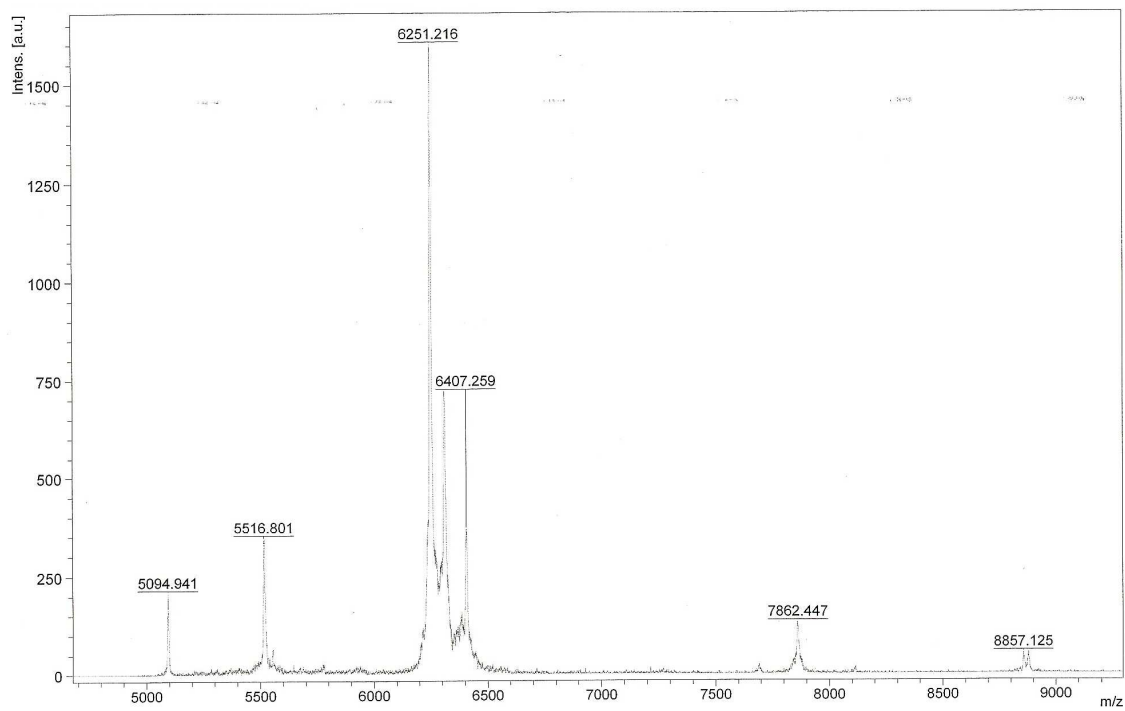


Figura 16

Espectrometria de massa da fração C11 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

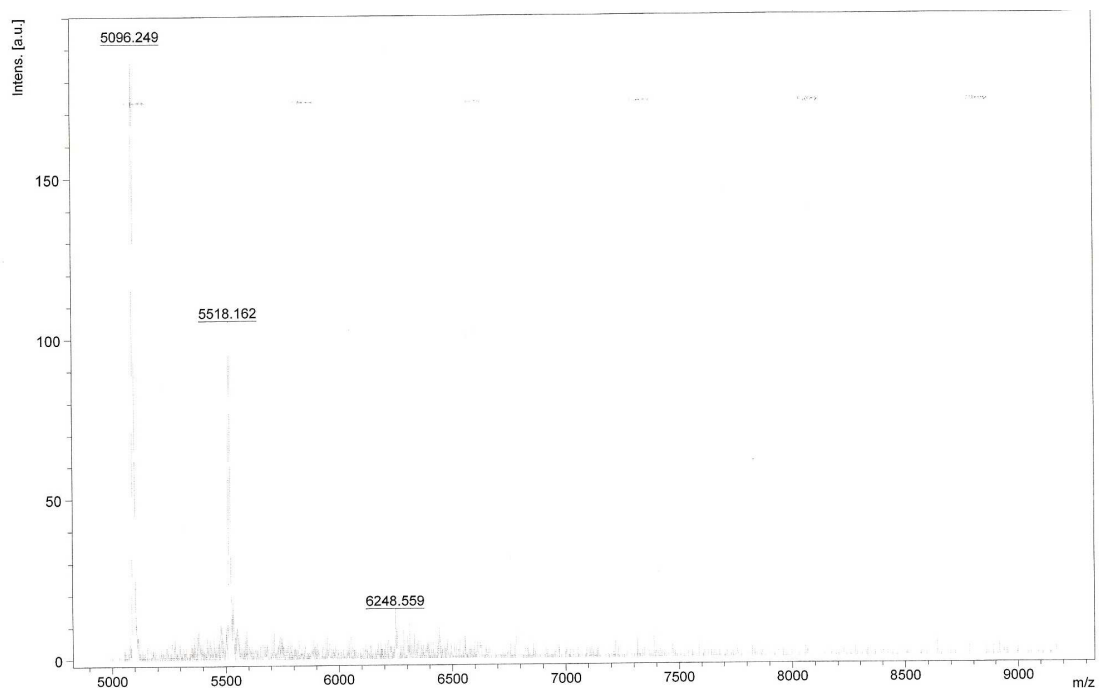


Figura 17

Espectrometria de massa da fração C12 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C18 do *pool* das frações 9 e 10 obtidas da cromatografia em coluna de gel filtração.

As frações C6, C7 e C8, eluídas em concentrações de acetonitrila de 76,0%, 79,7% e 84,8%, originadas da cromatografia em coluna Peptide C18 não apresentaram sinal quando submetidas a análise por espectrometria de massa.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os representantes do gênero *Shigella* são agentes etiológicos da disenteria bacilar ou shigelose, doença que acomete aproximadamente 150 milhões de indivíduos anualmente em países menos desenvolvidos e está associada a cerca de um milhão de mortes, mais da metade delas, de crianças. O microrganismo invade o epitélio do intestino grosso, desencadeando intensa resposta inflamatória. As manifestações clínicas mais comuns incluem eliminação de fezes diarreicas acompanhadas ou não de muco e pus, febre, náuseas, vômitos e cólicas abdominais (Parsot, 2005; Pazhani, *et al.*, 2005).

As amostras de *Shigella* podem produzir substâncias de caráter proteico denominadas bacteriocinas. As bacteriocinas exibem atividade antibacteriana especialmente contra amostras taxonomicamente relacionadas, desempenhando papel relevante nas relações ecológicas entre populações bacterianas (Reeves, 1972; Riley & Gordon *et al.*, 1999; Riley & Wertz, 2002).

Em decorrência de sua ação antagonista, a aplicabilidade de bacteriocinas tem se expandido. As substâncias podem ser utilizadas na conservação de alimentos ou como antibióticos “não convencionais”, como uma alternativa aos agentes antimicrobianos clássicos, aos quais muitas vezes as bactérias já apresentam resistência. Amostras produtoras de bacteriocinas podem também ser empregadas como probióticos (Belguesmia *et al.*, 2010).

A síntese de bacteriocinas já foi observada para diversas enterobactérias, inclusive *Shigella* (Cascales *et al.*, 2007). Existe relato de produção de colicinas por *S. flexneri* ativas contra *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* isolados da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis (Padilla *et al.*, 2004). Entretanto, a importância ecológica de bacteriocinas no ecossistema intestinal ainda não foi demonstrada de maneira conclusiva. Além da atividade de *S. flexneri* contra bactérias da microbiota intestinal indígena, *S. flexneri* pode ser inibida pela ação de membros desta microbiota, o que sugere que bacteriocinas possam desempenhar papel protetor da microbiota intestinal (Hentges, 1969).

Sousa e colaboradores (Sousa, 2010; Sousa *et al.*, 2010) investigaram a expressão de antagonismo por amostras de *Shigella* contra membros da microbiota intestinal indígena e contra outros grupos diarreiogênicos. Segundo os autores, entre as frações proteicas intracelulares, aquela precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) exibiu atividade inibitória contra um número maior de amostras reveladoras em comparação com as demais frações proteicas ativas e apresentou o maior de título de atividade antagonista.

Extratos intracelulares já foram utilizados com sucesso por outros autores (Miranda *et al.*, 1993; Farias *et al.*, 1994; Apolônio *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Ribeiro-Ribas *et al.*, 2009). Por estas razões, a fração foi selecionada para as etapas posteriores da investigação conduzida anteriormente, bem como do presente estudo. Sousa e colaboradores (Sousa, 2010; Sousa *et al.*, 2010) demonstraram a natureza proteica da substância e, então, caracterizaram uma substância antagonista presente na fração C-75.

Após cultivo da amostra SS9, a extração proteica foi realizada por precipitação com 30% e 75% de sulfato de amônio. A seguir, C-75 foi submetida a etapas sequenciais de cromatografia, visando à purificação de substância antagonista. Após cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q e teste de atividade das frações obtidas, 40 frações ativas foram detectadas. As frações 1 e 2, que não se ligaram à coluna produziram halos límpidos e maiores, bem como título de atividade antagonista elevado. Assim, as mesmas foram selecionadas para emprego nas fases subsequentes deste estudo.

A próxima etapa de cromatografia proposta foi também de troca iônica, porém, empregando uma coluna catiônica (Mono S). O perfil cromatográfico gerado foi igual àquele obtido na cromatografia em coluna aniônica, o que evidencia o caráter neutro do material presente nas frações 1 e 2 coletadas a partir da cromatografia em coluna Mono Q. Após análise dos dados gerados pelas cromatografias de troca iônica, optamos por utilizar a coluna Mono Q para a primeira etapa de purificação da substância. Assim, o *pool* das frações 1 e 2 oriundas da cromatografia em coluna Mono Q foi submetido à etapa subsequente de purificação proteica.

Após cromatografia em coluna de gel filtração molecular, 12 das 22 frações obtidas apresentaram atividade antagonista contra a amostra reveladora. Entre elas, as frações 9 e 10 foram selecionadas para a próxima etapa do estudo por apresentarem título mais elevado e perfil cromatográfico mais favorável.

A cromatografia de fase reversa em coluna C18 gerou 43 frações, das quais 11 exibiram atividade antagonista. Nesta etapa, não foi possível a titulação da atividade antibacteriana das frações devido à pequena quantidade de amostra obtida.

A análise em espectrometria de massa revelou a presença de substâncias com massas moleculares distintas, variando de cerca de 5 a 10 kDa. Em especial, foram observadas duas substâncias, uma com massa molecular de 6,4 kDa presente em todas as frações exceto na C12 e outra com massa de 7,2 kDa observadas nas frações C3 a C10. O dado pode sugerir que estas proteínas correspondam a substâncias antagonistas sintetizadas por *S. sonnei*. Caso

a hipótese seja confirmada, com base na massa molecular das substâncias, as mesmas se encaixariam na classe das microcinas (Dirix *et al.*, 2004).

Devido ao perfil obtido na cromatografia de fase reversa em coluna C18, a fração C6 foi submetida a cromatografia em coluna Peptide C18. O perfil cromatográfico mostrou vários picos, o que indica a presença de substâncias com massas moleculares diferentes na fração C6. Este resultado é concordante com o obtido pela análise por espectrometria de massa da fração C6 obtida da cromatografia de fase reversa em coluna C18, que revelou a presença de três substâncias com massas distintas. As frações C6, C7 e C8, eluídas em concentrações de 75 a 85% de acetonitrila na cromatografia em coluna Peptide C18, foram encaminhadas para análise por espectrometria de massa, mas, possivelmente em decorrência da quantidade pequena de material, não apresentaram sinal.

Os dados demonstram a necessidade de prosseguimento dos ensaios, incluindo etapas de cromatografia e sequenciamento da porção N-terminal, para melhor caracterização das substâncias detectadas. Sugerem, ainda, a possibilidade de que a amostra de *S. sonnei* SS9 seja capaz de produzir diversas substâncias antagonistas de natureza proteica. De fato, segundo Sousa (2010), amostras de *S. sonnei* frequentemente albergam genes responsáveis pela síntese de mais de uma bacteriocina, tanto colicina como microcina. O fato pode provavelmente ser explicado pela vantagem seletiva que a propriedade confere aos organismos produtores.

Assim, a amostra de *S. sonnei* SS9 expressa antagonismo contra a amostra SS12, aparentemente por meio da síntese de mais de uma substância com atividade antibacteriana. A continuação desta investigação possibilitará o melhor conhecimento do fenômeno, incluindo a caracterização da(s) substância(s) antagonista(s) detectada(s).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAKO, K.; MATSUGUCHI, 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.

ANGELINI, M.; STEHLING, E. G.; MORETTI, M. L.; SILVEIRA, W. D. Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, p. 685-692, 2009.

APOLÔNIO, A. C.; CARVALHO, M. A.; 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, 2007.

BANDO, S. Y.; MORENO, A. C. R.; ALBUQUERQUE, J. A. T.; AMHAZ, J. M. K.; FILHO, C. A. M.; MARTINEZ, M. B. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 786-791, 2010.

BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, p. 837-848, 2006.

BELGUESMIA, Y.; MADI, A.; SPERANDIO, D.; MERIEAU, A.; FEUILLOLEY, M.; PREVOST, H.; DRIDER, D.; CONNIL, N. Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. *Res. Microbiol.*, v. 161, p. 1-5, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHÉ, D.; KLEANTHOS, C.; LLOUBÈS, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 71, p. 158-229, 2007.

CHAVAN, M.; RAFI, H.; WERTZ, J.; GOLDSTONE, C.; RILEY, M. A. Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. *J. Mol. Evol.*, v. 60, p. 546-556, 2005.

DHILLON, T. S.; HUI, Y. W.; TEOH-CHAN, C. H.; DHILLON, E. K. S. Accessory replicons of species of *Salmonella* and *Shigella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, p. 825-831, 1982.

DIRIX, G.; MONSIEURS, P.; DOMBRECHT, B.; DANIELS, R.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Peptide signal molecules and bacteriocins in gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides*, v. 25, p. 1425-1440, 2004.

EVERSE, J.; STOLZENBACH, F. E. Lyophilization. In: JAKOBY, W. B. (Ed.) *Methods Enzymol.*, v. 22, p. 33-39, 1971.

FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M.; CARVALHO, M. A.; DAMASCENO, C. A.; TAVARES, C. A.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicilata*. *Res. Microbiol.*, v. 145, p. 9-16, 1994.

FARSHAD, S.; SHEIKHI, R.; JAPONI, A.; BASIRI, E.; ALBORZI, A. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of *ipa* genes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 2879-2883, 2006.

HENTGES, D. J. Inhibition of *Shigella flexneri* by the normal intestinal flora. *J. Bacteriol.*, v. 97, p. 513-517, 1969.

HORÁK, V. Seventy colicin types of *Shigella sonnei* and an indicator system for their determination. *Zentbl. Bakteriolog.*, v. 281, p. 24-29, 1994.

JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS. Microbiol. Rev.*, v. 28, p. 43-58, 2004.

JEZIOROWSKI, A.; GORDON, D. Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 7045–7052, 2007.

LIMA, F. L.; CARVALHO, M. A. R.; APOLÔNIO, A. C. M.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; OLIVEIRA, J. S.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M. Actinomycetemcomitin: a new bacteriocin produced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 103-110, 2008.

LINE, J. E.; SVETOCH, E. A.; ERUSLANOV, B. V.; PERELYGIN, V. V.; MITSEVICH, E. V.; MITSEVICH, I. P.; LEVCHUK, V. P.; SVETOCH, 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.

MADIYAROV, R. S.; BEKTEMIROV, A. M.; IBADOVA, G. A.; ABDUKHALILOVA, A. V.; KHODIEV, A. V.; BODHIDATTA, L.; SETHABUTR, O.; MASON, C. J. Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan. *Gut Pathog.*, v. 2, p. 1-18, 2010.

MIRANDA, C. M.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; DAMASCENO, C. A.; TOTOLA, A. H.; TAVARES, C. A.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Purification and partial characterization of a bacteriocin isolated from *Bacteroides ovatus* H47. *Can. J. Microbiol.*, v. 39, p. 169-174, 1993.

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

PADILLA, C.; LOBOS, O.; BREVIS, P.; ABACA, P.; HUNBERT, E. Plasmid-mediated bacteriocin production by *Shigella flexneri* isolated from dysenteric diarrhoea and their transformation into *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 42, p. 300-303, 2006.

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.

PARSOT, C. *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 252, p. 11–18, 2005.

PAZHANI, G. P.; RAMAMURTHY, T.; MITRA, U.; BHATTACHARYA, S. K.; NIYOGLI, S. K. Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella spp.* isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata (Calcutta), India. *Epidemiol. Infect.*, v. 133, p. 1089–1095, 2005.

REEVES, P. *The bacteriocins*. New York: Spring-Verlag, p. 142, 1972.

RIBEIRO-RIBAS, R. N.; CARVALHO, M. A. R.; VIEIRA, C. A.; APOLÔNIO, A. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; MENEZES, 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.; 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, Paris*, v. 84, p. 357-364, 2002.

ŠMAJS, D.; MICENKOVÁ, L.; ŠMARDÁ, J.; VRBA, M.; ŠEVČÍKOVÁ, A.; VALIŠOVÁ, Z.; WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol.*, v. 10, p. 288-298, 2010.

SMAJS, D.; PILSL, H.; BRAUN, V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J. Bacteriol.*, v. 179, p. 4919-4928, 1997.

SMARDA, J.; PETRZELOVA, J.; VYSKOT, B. Colicin Js of *Shigella sonnei*: classification of type colicin "7". *Zentbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. Ser. A*, v. 263, p. 530-540, 1987.

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.

SOUSA, M. A. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. *APMIS: Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 118, p. 125-135, 2010.

TALUKDER, K. A.; ISLAM, Z. D.; DUTTA, K.; ISLAM, M. A.; KHAJANCHI, B. K.; AZMI, I. J.; IQBAL, M. S.; HOSSAIN, M. A.; FARUQUE, A. S. G.; SACK, G. B. N.; DAVID, A. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolated from patients with diarrhoea between 1999 and 2003 in Bangladesh. *J. Med. Microbiol.*, v. 55, p. 1257 – 1263, 2006.

TIGYI, Z.; KISPAL, G.; PAL, T. Identification of the plasmid and the structural gene of colicin type 7 of *Shigella sonnei*. *Acta. Biol. Hung.*, v. 56, p. 359-373, 2005.

ZHANG, Y.; VANKEEMMELBEKE, M. N. N.; HOLLAND, L. E.; WALKER, D. C.; JAMES, R.; PENFOLD, C. N. Investigating early events in receptor binding and translocation of colicin E9 using synchronized cell killing and proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 4342–4350, 2008.