

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/10/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA UNESP/IBILCE

Vinicius Moreira Vidotto

**Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de
reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de
*Staphylococcus aureus***

São José do Rio Preto

2023

Vinicius Moreira Vidotto

Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - 88887.649397/2021-00

Orientador: Dr. Jorge Enrique Hernández González

Co-orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto

2023

V654a

Vidotto, Vinicius Moreira

Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de *Staphylococcus aureus* / Vinicius Moreira Vidotto. -- São José do Rio Preto, 2023

101 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Jorge Enrique Hernández González

Coorientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Microbiologia. 2. Biologia molecular. 3. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Vinicius Moreira Vidotto

Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Banca examinadora

1. Prof. Dr. Jorge Enrique Hernández González (Orientador) Pós-doutorando / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto.
2. Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira. Depto. de Ciências Químicas e Biológicas, UNESP/IB/Câmpus Botucatu.
3. Prof. Dr. Felipe Antunes Calil. University of California San Diego.

São José do Rio Preto

06 de outubro de 2023

Dedico este trabalho a minha família, em especial as mulheres da minha vida, minha mãe Liliane, avó Neuza, tia Nice e madrinha Rose, pelo apoio incondicional e atemporal.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A minha Madrinha Rose e meu padrinho Cláudio que desde sempre me possibilitaram sonhar e realizar.

Agradeço a minha namorada, Mariana, por sempre acreditar no meu potencial e ser meu porto seguro.

A todos da equipe de pesquisa e do laboratório, que me auxiliaram com paciência em tudo que era preciso.

Ao professor Arni que disponibilizou o laboratório, equipamentos e reagentes.

Ao meu orientador, Dr. Jorge Enrique Hernández González, pela paciência, apoio, consideração e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos, que sempre me fizeram sentir em casa.

Aos meus professores pelo aprendizado e por proporcionarem uma ótima formação.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com o presente trabalho.

Ao Ibilce, por ser minha segunda casa há uma década.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.649397/2021-00, à qual agradeço.

“[...] Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.

Fernando Pessoa (1959, p. 16).

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um microorganismo responsável pela Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE) em algumas espécies de animais, inclusive em humanos. É uma doença que promove lesões cutâneas graves, causada por toxinas esfoliativas (ETs) de *S. aureus* (ETA e ETB no caso de humanos), as quais são serino-proteases do tipo quimotripsina (SPTQs) que clivam a caderina desmogleína 1 (Dsg1). Resultados prévios sugerem a ativação da cavidade oxianiónica das ETs antes da clivagem da Dsg1, através de uma mudança conformacional do resíduo Pro192 após a interação das toxinas com o substrato. Por causa da alta especificidade das ETs, as mesmas não degradam diversos substratos peptídicos e não são suscetíveis a inibidores clássicos das SPTQs. Porém, as bases moleculares para esta alta especificidade permanecem incompreendidas, dada não só à falta de informações estruturais sobre a interação dessas enzimas com os ligantes do sítio ativo, mas também, e principalmente, com seu substrato natural, a Dsg1. Todavia, o isolamento de cepas de *S. aureus* codificadoras das ETs com resistência a antibióticos aumenta a importância da busca de inibidores para ETA a fim de tratar as lesões cutâneas decorrentes das infecções por essas cepas. O objetivo geral deste trabalho foi expressar e purificar a proteína ETA wt para a realização de ensaios de cristalização, inibição da atividade enzimática e cristalização com ligantes promissores. Foi realizada a prospecção de potenciais inibidores peptídicos e carbônicos, inicialmente determinados *in silico* e depois testados *in vitro*. Os inibidores carbônicos demonstraram uma inibição da ETA nos ensaios enzimáticos. Todavia, a técnica Phage Display também foi empregada na bioprospecção de sequências peptídicas com alta afinidade ao alvo ETA. Os resultados do sequenciamento genético aliado a ferramentas computacionais demonstraram que existem algumas sequências peptídicas relacionadas a proteínas humanas de superfície como a Protocaderina-15. Por fim, a realização da cristalização da proteína ETA wt foi bem sucedida, e, porém, os ensaios de cristalização da ETA com ligantes promissores ainda não apresentaram resultados satisfatórios. A determinação da estrutura cristalográfica da enzima associada a um inibidor pode proporcionar informações acerca do mecanismo de acomodação dos ligantes nos sítios ativos das toxinas ou nos sítios secundários moduladores.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*. Síndrome da pele escaldada estafilocócica. Toxina esfoliativa. Ensaios de cristalização. Desmogleína 1. Phage Display.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a human pathogen responsible for Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS), a disease that causes severe skin lesions, driven by the exfoliative toxins (ETs) of *S. aureus* (ETA and ETB in the case of humans). These toxins are chymotrypsin-like serine proteases (CTSs) that cleave desmoglein1 (Dsg1). Previous results suggest the activation of the ETs' oxyanion hole before Dsg1 cleavage, via a conformational change of the Pro192 residue following toxin-substrate interaction. Due to the high specificity of the ETs, they don't degrade various peptide substrates and aren't susceptible to classic CTS inhibitors. However, the molecular bases for this high specificity remain poorly understood, not only due to the lack of structural information about these enzymes interacting with the active site ligands but also, and mainly, with their natural substrate, Dsg1. Still, the isolation of *S. aureus* strains encoding the ETs that are antibiotic-resistant heightens the importance of searching for ETA inhibitors to treat skin lesions resulting from these strain infections. The general objective of this study was to express and purify the wild-type ETA protein for crystallization assays, enzymatic activity inhibition, and co-crystallization with promising ligands. A prospecting of potential peptide and organic inhibitors was performed, initially determined *in silico* and later tested *in vitro*. The organic inhibitors showed ETA inhibition in enzymatic assays. However, the Phage Display technique was also used in the bioprospecting of peptide sequences with high affinity to the ETA target. Genetic sequencing results combined with computational tools showed that there are some peptide sequences related to human surface proteins like Protocadherin-15. Lastly, crystallization of the wild-type ETA protein was successful, and co-crystallization assays of ETA with promising ligands are underway. Determining the crystallographic structure of the enzyme associated with an inhibitor might provide insights into the mechanism of ligand accommodation in the active or modulatory secondary sites of the toxins.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Staphylococcal scalded skin syndrome. Exfoliative toxin. Crystallization tests. Desmoglein 1. Phage display.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Em (A) representação em fita da estrutura cristalina da V8 protease, uma GEPase convencional (PDB: 2O8L) a esquerda, e da ETA a direita (PDB: 1EXF). Os resíduos da tríade catalítica Asp, His e Ser são representados em um modelo em bastão em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. Exceto por uma hélice adicional característica das toxinas esfoliativas e pela conformação de algumas alças superficiais, o enovelamento geral de ambas as enzimas são semelhantes. (B) A sobreposição dos resíduos da tríade catalítica da GEPase e dos resíduos correspondentes da ETA, mostrados em vermelho e azul claro, respectivamente, demonstra que esta importante parte da maquinaria catalítica está bem desenvolvida na estrutura da toxina. Por outro lado, o buraco oxianion não é pré-formado na estrutura da ETA, como demonstrado pelas diferentes orientações do oxigênio carbonílico da ligação peptídica Pro192-Gly193 na ETA e a ligação peptídica G166-G167 correspondente na glutamilendopeptidase (círculo tracejado).....**28**

Figura 2. Estruturas cristalinas das ETs. A) Representações da cadeia principal e principais resíduos envolvidos no processo de catálise da ETA (PDB: 1EXF), ETB (PDBs: 1DT2, varetas magentas e 1QTF, varetas ciano) e a ETE (PDBs: 5C2Z, varetas ciano e 8DAX, varetas magentas). As principais características estruturais dessas proteínas são mostradas: a tríade catalítica Asp102-His75-Ser195, uma α -hélice N-terminal, a presença no bolsão S1 dos resíduos Thr190, His213 e Lys216, que são cruciais para a especificidade para Glu-P1, conformações de P/V192(O) atípicas e a alça D, que acredita-se controlar a orientação de Pro192(O) na ETA. B) Representações em varetas das conformações de P/V192 (O) alternativas observadas nas estruturas cristalinas disponíveis da ETA, ETB e ETE. Em todos os casos, as linhas tracejadas laranjas representam ligações de hidrogênio (ligações H). Os resíduos são marcados de acordo com o sistema de numeração da quimotripsina. Nota-se a presença de uma molécula de água, marcada com a letra w, que forma uma ponte de água (esfera vermelha) entre Gly193(N) e Y143(N) na estrutura cristalina da ETE (PDB: 5C2Z) e que ocupa uma posição equivalente à de Pro192(O) na conformação invertida.....**30**

Figura 3. Representação esquemática da distribuição de desmogleína em (A) pele saudável e (B) pele exposta às ETs34

Figura 4. Sobreposição dos modelos estruturais indicando os 5 ectodomínios (ECs) de Dsg1 humana (laranja; hDsg1), Dsg1 canina (verde; cDsg1) e Dsg1 murina (azul; mDsg1). As esferas cinzas representam íons de cálcio e o ácido glutâmico (Glu381) do sítio de clivagem é indicado por uma seta preta. As sequências de aminoácidos da Dsg1 humana, murina e canina, 110 resíduos a montante do sítio de clivagem, estão destacadas. A letra x indica resíduos de aminoácidos das Dsgs1 considerados não cruciais para o reconhecimento e clivagem das Dsgs1 pela ETA.....35

Figura 5. Sequência de proteína ExhC (I), ETE (II) e ETA (III) com uma cauda de poli-His (amarelo) e um sítio de clivagem TEV protease (ciano).....40

Figura 6. Processo de biopanning com uma biblioteca de peptídeos pentavalentes exibida. A estrutura alvo é fixada na placa de alta ligação (que no caso deste trabalho são as ETs), e na sequência expor a biblioteca de fagos selecionada sobre o alvo. Após isso, inicia-se a lavagem da superfície para eliminar os fagos com baixa afinidade, e na sequência os fagos que ficaram aderidos após a lavagem apresentam uma maior afinidade pelos alvos. Esses foram eluídos e posteriormente amplificados. A repetição desse processo de 2 a 3 vezes promove a seleção dos fagos de alta afinidade.....50

Figura 7. Bibliotecas de peptídeos disponíveis no NEB (New England Biolabs). Segmentos randomizados e sequências de linker são indicados.....52

Figura 8. SDS-PAGE 15% ExhC wt (A) de *S. sciuri*, ETE wt (G) e ETA wt (H) de *S. aureus* com diferentes concentrações de Imidazol: 40 mM de Imidazol (40); 60 mM de Imidazol (60); 80 mM de Imidazol (80) e eluição com 400 mM de Imidazol (E). As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas recombinantes e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa.....56

Figura 9. Segunda etapa de purificação da proteína ExhC wt de *S. sciuri*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ExhC wt de *S. sciuri* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância a 230 nm e a linha rosa indica a absorbância em 280 nm.....**58**

Figura 10. Segunda etapa de purificação da proteína ETE wt de *S. aureus*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ETE wt de *S. aureus* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm e linha rosa indica a absorbância em 280 nm.....**59**

Figura 11. Segunda etapa de purificação da proteína ETA wt de *S. aureus*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ETA wt de *S. aureus* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm e linha rosa indica a absorbância em 280 nm.....**60**

Figura 12. SDS-PAGE 15% ExhC wt (A) de *S. sciuri*, ETE wt (G) e ETA wt (H) de *S. aureus*. Os números 4, 5 e 6 (A), 3, 4, 5, 6 e 7 (G) e 5, 6 e 7 (H) dos géis SDS-PAGE 15% indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos das proteínas ExhC wt, ETE wt e ETA wt respectivamente, projetados pelo sistema AKTA-pure. As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas recombinantes e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa.....**61**

Figura 13. Resultados do Western blot para detecção das proteínas ExhC wt (A), e ETA (J) de *S. aureus*. As proteínas alvo foram detectadas (seta preta) à direita do marcador molecular (Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare) em kDa (M).....**62**

Figura 14. Determinação dos parâmetros cinéticos ETA. Os painéis superiores mostram os gráficos de Michaelis-Menten e Hanes-Woolf para a enzima. No painel inferior contém os valores dos parâmetros cinéticos estimados a partir dos gráficos de Hanes-Woolf por meio de regressão linear. V_o , $[S]$, K_M , V_{max} e k_{cat} representam a velocidade inicial, concentração de substrato, constante de Michaelis, velocidade máxima e constante catalítica, respectivamente. A razão k_{cat}/K_M quantifica a eficiência catalítica de cada enzima. Valores médios $\pm$ erros padrão da média são mostrados.....**63**

Figura 15. Espectro de CD-UV característico da proteína ETA de *S. aureus* a 25 °C em solução tampão. O eixo y do gráfico corresponde a elipticidade molar em $\text{deg.cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ e o eixo x ao comprimento de onda em nanômetros.....**64**

Figura 16. Gráfico de porcentagem da viabilidade celular por ensaios de MTT das células BHK-21 na presença da proteína ETA de *S. aureus*. Os resultados plotados representam três experimentos independentes que se apresentam como média $\pm$ SD. O eixo y corresponde a viabilidade das células BHK-21 em porcentagem (calculada a partir do experimento controle na ausência de PBS 1X) e o eixo x as concentrações da ETA em μM**65**

Figura 17. Representação estrutural de ETA em complexo com α -MSH, β -MSH e derivados. A) ETA: α -MSH. B) ETA: α MSH-curto C) ETA:D- α - MSH D) ETA: β - MSH.. Os peptídeos são representados como bastões amarelos, enquanto a estrutura da proteína é representada como desenho e os resíduos que interagem com os peptídeos são representados como bastões verdes e sua superfície é mostrada em cinza. As ligações H intermoleculares são indicadas por linhas tracejadas laranja. Os principais resíduos de sítios ativos e interativos das toxinas são rotulados. Em todos os casos as estruturas centrais correspondentes aos maiores agrupamentos de cada trajetória foram escolhidas para representação estrutural. Os subsítios S1 e S4' estão marcados em itálico.....**68**

Figura 18. Alinhamento da sequência de α -MSH, β -MSH e hDsg-1 EC3-4linker de acordo com as posições que ocupavam nos sítios ativos dos ETs. As posições de P4 a P4' são indicadas no topo. Local de clivagem marcado por uma seta ($\downarrow$).....69

Figura 19. Atividade enzimática da proteína nativa (ETA), incubada com o peptídeo D- α MSH, e também associada ao peptídeo linear 1, em incubação de 1h e também de 18h, com concentração 20 mM de substrato BocL-Glu- $\downarrow$ OPh.....73

Figura 20. Demonstração in silico da interação entre os possíveis ligantes e as porções do sítio ativo da enzima. Em A) temos o resíduo de ácido na posição P1. B) Ligações de H com His213 e Thr213. C) Interação com Lys216. D) Ligação de Hidrogênio entre Gly193 e Ser195.....74

Figura 21: Compostos químicos utilizados em ensaios para inibir a atividade enzimática de ETA e ExhC contra o substrato sintético BocL-Glu- $\downarrow$ OPh. Os compostos foram selecionados por triagem virtual para a inibição do sítio ativo de toxinas esfoliativas.....75

Figura 22. Teste de atividade ETA controle DMSO. As seguintes concentrações finais de DMSO no ensaio de atividade foram testadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 e 20%.....77

Figura 23. Teste primário de ETA com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).....78

Figura 24. Teste de atividade ETA controle DMSO. As seguintes concentrações finais de DMSO no ensaio de atividade foram testadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 e 20%.....79

Figura 25. Teste primário de ETA e ExhC com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).....80

Figura 26. Compostos carbônicos mais promissores nos testes de inibição da atividade enzimática. As letras foram usadas para referir aos compostos de forma mais

simplificada.....81

Figura 27. Efeito de inibição e curva de resposta à dose dos compostos selecionados sobre ETA. A e B: Composto A. C e D: Composto G. E e F: Composto M. G e H: Composto H. I e J: Composto J. Os dados mostrados são a média $\pm$ SD de três medições independentes.....82

Figura 28. Efeito de inibição e curva de resposta à dose dos compostos selecionados sobre ExhC. A e B: Composto A. C e D: Composto G. E e F: Composto H. G e H: Composto J. Os dados apresentados são a média $\pm$ DP de três medições independentes.....84

Figura 29. Cristal contendo ETA wt.....85

Figura 30. Cristais obtidos através do método Difusão de Vapor, em que a condição da solução precipitante foi PEG 4000 (23-26%) e 1% de DMSO e pH 6,5, sobre gotas contendo ETA wt + peptídeo D- α -MSH.....86

Figura 31. Comparação da densidade eletrônica encontrada na difração de Raios X. Em (A) é possível visualizar a estrutura que acreditamos ser o PEG 4000 associado a ETA wt; Em (B) densidade eletrônica típica das ramificações aparentadas no peptídeo D- α -MSH.....87

Figura 32. Placas de titulação de cultura de E. coli ER2738 após infecção por fagos obtidas da biblioteca C7C (New England Biolabs). Os fagos foram selecionados com base na interação dos peptídeos presentes em seus capsídeos virais e a toxinas ETA durante os ciclos de bioprospecção de exibição de fagos.....88

Figura 33. Gel de agarose a 1% de amostras de DNA do vírus M13 após extração e PCR de fagos M13 com inserções de sequências de nucleotídeos que codificam os peptídeos do capsídeo viral, e marcador molecular (M).....89

Figura 34: sequências traduzidas do DNA dos phagos selecionadas por alta afinidade ao alvo ETA.....90

Figura 35: Sequências de alta afinidade ao alvo ETA relacionados a fragmentos de sequências relevantes encontradas na natureza.....92

Figura 36. Em amarelo está representada a sequência obtida por phage display e posteriormente encontrada via blast com altíssima identidade e contida na proteína Dsg-4 murina. Em verde está a estrutura da Dsg-4 gerada por alpha fold e em amarelo está representada a sequência contida na Dsg-4 que apresentou match via blast quando a busca foi realizada com a sequência CSRSTHASC.....**93**

Figura 37. Em amarelo está representada a sequência obtida por phage display e posteriormente encontrada via blast com altíssima identidade e contida na proteína Protocaderina-15. Em verde está a estrutura da protocaderina 15 gerada por alpha fold e em amarelo está representada a sequência contida na protocaderina-15 que apresentou match via blast quando a busca foi realizada com a sequência: CDIYGTEQC.....**93**

Lista de tabelas

Tabela 1. Tampões utilizados para a diálise das proteínas alvo de acordo com condições experimentais. Cromatografia de exclusão molecular (SEC); Dicroísmo Circular (CD); Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Viabilidade celular (ensaios de MTT).....	43
Tabela 2. O termociclador utilizado Thermal Cycler C1000 Touch (BIO-RAD) para as reações de PCR foi programado nas condições apresentadas.....	52
Tabela 3. Dados das sequências primárias das proteínas ETA wt, ETE wt, ExhC wt, obtidos pelo programa ProtParam (ExPASy).....	54
Tabela 4. Resultados em porcentagem das frações de estrutura secundária da proteína ETA de <i>S. aureus</i> obtida por meio do experimento de UV-CD. A deconvolução e o cálculo das porcentagens de estrutura secundária foram realizados pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPPro utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29.....	63
Tabela 5. Efeitos do aumento progressivo da concentração da proteína ETA na viabilidade da linhagem celular BHK-21 em porcentagem (calculada a partir do experimento controle na ausência de PBS 1X) por ensaios de MTT. Os resultados representam três experimentos independentes que se apresentam como média $\pm$ SD. Diferença estatisticamente significativa entre os controles na ausência/presença do tampão PBS 1X e as amostras tratadas com ETA não foi comprovada pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).....	65
Tabela 6. Estabilidade de ETA em complexos com diferentes peptídeos.....	66
Tabela 7. Maiores contribuições de energia livre por resíduo para a formação do complexo ETA: α -MSH.....	72
Tabela 8. Valores de de compostos IC 50 direcionados a ETA.....	82
Tabela 9. Valores de IC 50 ExhC.....	82

Tabela 10. Número de colônias obtidas de cada etapa de titulação após ciclos de bioprospecção de exibição de fagos realizados com a biblioteca (New England Biolabs) e ETE, ETA e ExhC. T: titulação do alvo. NC: não contável.....**87**

Lista de Abreviaturas e Siglas

Arg	Arginina
Asp	Aspartato (Ácido aspártico)
Asn	Asparagina
BCIP/NBT	5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate/nitro-bluetetrazolium
CD	Dicroísmo Circular
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
Dsg-1	Desmogleína 1
Dsgs	Desmogleínas
Dscs	Desmocollinas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
MD	Dinâmica Molecular
EE	Epidermite Exsudativa
ECs	Ectodomínios
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETA	Toxina Esfoliativa A
ETB	Toxina Esfoliativa B
ETD	Toxina Esfoliativa D
ETs	Toxinas Esfoliativas
ExhC	Toxina Esfoliativa ExhC
GEPases	Glutamil-endorpeptidases
Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
Gln	Glicina
His	Histidina
H	Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria-Bertani
Lys	Lisina
LPS	Lipopolissacarídeo da Membrana Externa
Met	Metionina

MM-GBSA	Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
NaF	Fluoreto de sódio
Ni	Níquel
Nm	Nanômetro
OD	Densidade Ótica
PEG	Polietilenoglicol
Pro	Prolina
Phe	Fenilalanina
pI	Ponto isoelétrico teórico
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Desvio quadrático médio da raiz
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio
SPTQ	Quimotripsinas
SPEE	Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
wt	Wt
β-MSH	Peptídeo hormônio estimulante de beta-melanócitos
α-MSH	Peptídeo hormônio estimulante de alfa-melanócitos
µg	Microgramas
3D	Tridimensional
-OH	Hidroxila
µL	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

[]	Concentração
Km	Eficiência cinética
kcal	Quilocaloria
nm	Nanômetro
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
g	Grama
mg	Miligrama
μg	Micrograma
s	Segundo
min	Minuto
°C	Graus Celsius
mol	Mol
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
Å	Ångström
V	Volts
kb	Quilobases
pb	Pares de base
Rpm	Rotações por minuto
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs
ΔS	Variação de entropia
ΔG _{eff}	Energia Livre Efetiva
T	Temperatura
Da	Dalton
kDa	Quilodalton
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem
IC ₅₀	Concentração inibitória média

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE) de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.2 Toxinas esfoliativas do gênero <i>Staphylococcus</i>	26
1.3 Alvo das toxinas esfoliativas na adesão celular da pele	33
2. OBJETIVOS	38
3. JUSTIFICATIVA	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Vetores de expressão em <i>Escherichia coli</i>	40
4.2 Análise da sequência primária das proteínas de estudo	41
4.3 Transformação bacteriana	41
4.4 Expressão das proteínas alvo	42
4.5 Purificação das proteínas alvos	42
4.6 Diálise das proteínas alvo	44
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%	45
4.8 Western blot	45
4.9 Aquisição de compostos potencialmente inibidores	46
4.10 Dicroísmo Circular (CD)	46
4.11 Ensaios de cristalização e co-cristalização.....	47
4.12 Ensaios Enzimáticos	47
4.13 Exibição de fagos com biblioteca de peptídeos (Phage Display).....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Análise da sequência primária das proteínas alvo	55
5.2 Expressão das proteínas alvo	55
5.3 Purificação das proteínas recombinantes	56
5.4 Western blot	62
5.5 Ensaios de atividade enzimática	62

5.6 Dicroísmo Circular	63
5.7 Ensaios MTT	65
5.8 Identificação in silico de inibidores contra a Toxina Esfoliativa A (ETA)	66
5.9 Inibidores carbônicos da ação esfoliativa.....	73
5.10 Co-cristalização de toxinas esfoliativas com potenciais inibidores peptídicos.....	85
5.11 Phage Display.....	87
6. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE) de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são bactérias Gram catalase-positivas, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporuladas. Estas bactérias apresentam capacidade de adaptação a diferentes ambientes e alta capacidade de dispersão, além de serem resistentes à dessecação, sobrevivendo em ambientes não fisiológicos (COUTO et al., 2000; DAKIC et al., 2005). Até o momento, foram descritas 33 espécies de estafilococos, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (CHESNEAL et al., 1993). Além disso, são amplamente distribuídas na natureza e podem fazer parte da microbiota da pele e mucosa de uma grande parte dos mamíferos (GIAMMARINARO et al., 2005). Também, o *S. aureus* pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, além de estar presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (CARVALHO et al., 2005). Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais (CARVALHO et al., 2005).

Ao contrário de muitas bactérias, cuja virulência depende principalmente da produção de um único ou limitado número de fatores de virulência aos quais os sintomas clínicos observados podem ser diretamente atribuídos, os estafilococos secretam um amplo espectro de diversas proteínas extracelulares, que tornam a bactéria virulenta, promovendo desde infecções de pele como a Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE), até pneumonias e septicemias. (ALVES et al., 2009). Sendo assim, algumas das doenças provocadas por *S. aureus* são causadas pela produção de toxinas, como a SPEE, enquanto outras doenças resultam da proliferação dos microrganismos, levando à formação de abscessos e a destruição dos tecidos como infecção cutânea, endocardite, pneumonia, empiema, osteomielite e artrite séptica (MURRAY, 2009).

A SPEE é o termo usado para designar várias doenças de pele características pela formação de bolhas no tecido epidérmico, que são causadas pela ação local de Toxinas Esfoliativas (ETs) do *S. aureus*, também conhecidas como toxinas “epidermolíticas” (BUKOWSKI et al., 2010). Os primeiros sintomas da SPEE incluem

febre, mal-estar, letargia e diminuição do apetite, que são seguidos por erupção eritematosa e bolhas grandes, frágeis e cheias de líquido. As bolhas estouram com ação mecânica, deixando as partes afetadas do corpo sem uma camada protetora de epiderme (LADHANI et al., 1999). A SPEE afeta grande parte do corpo com lesões geralmente estéreis e que, em sua forma localizada, é conhecida como impetigo bolhoso, ambas as condições compartilham a mesma origem e diferem apenas na extensão dos danos à pele. (BUKOWSKI et al., 2010). A SPEE é predominante em neonatos e bebês, mas adultos com sistema imunológico e função renal comprometidos também são suscetíveis (BUKOWSKI et al., 2010). Notavelmente, casos de adultos saudáveis que desenvolvem a SPEE também têm sido relatados. A mortalidade infantil é relativamente baixa, ~ 5%, mas é expressivamente maior em adultos, chegando a 59%, de acordo com alguns estudos. A maior mortalidade em adultos é explicada pelo fato de a SPEE ocorrer predominantemente com doença subjacente grave (BUKOWSKI et al., 2010).

O diagnóstico pode distinguir a SPEE de outras doenças de pele, como necrólise epidérmica tóxica, epidermólise bolhosa, eritema multiforme bolhoso ou listeriose e queimaduras térmicas ou químicas, todas as quais podem se manifestar com sintomas semelhantes (LADHANI et al., 1999). Os métodos mais simples e adequados de diagnóstico de rotina são PCR para genes que codificam toxinas ou análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (SAKURAI et al., 1995; JOHNSON et al., 1991). O tratamento comum consiste na administração de antibióticos intravenosos (CRIBIER et al., 1994). No entanto, cepas resistentes podem se tornar um problema no futuro (YAMAGUCHI et al., 2002). Problemas com o tratamento da SPEE associado à cepas resistentes à meticilina já foram relatados no Japão (NOGUCHI et al., 2006). Além do tratamento com antibióticos, também são recomendados manter a temperatura corporal e proteger a pele desnuda para prevenir infecções secundárias e perda de líquidos (LADHANI et al., 1999).

1.2 Toxinas esfoliativas do gênero *Staphylococcus*

As características da SPEE foram descritas pela primeira vez pelo Barão Gottfried Ritter Von Rittershain em 1878 (VON RITTERSHAIN, 1878). No entanto, foi somente em 1967 que a relação entre a esfoliação da pele e o *S. aureus* foi determinada por Lyell (LYELL, 1967). Este atraso significativo foi causado pelo fato de o fluido da bolha e as regiões esfoliadas estarem frequentemente livres de estafilococos cultiváveis, porque a toxina é distribuída a partir de locais distantes de infecção através da corrente sanguínea. A existência de uma toxina hipotética foi sugerida por Lyell e confirmada por Melish *et al.* em 1972, que demonstrou a indução de bolhas com filtrados estéreis de culturas bacterianas (MELISH *et al.*, 1972). Até o momento, dois sorotipos de ETs de natureza proteica, denominadas ETA (UniProtKB: P09331) e ETB (UniProtKB: P09332), foram associados ao aparecimento da SPEE e do impetigo bolhoso em humanos. Os genes que codificam essas toxinas foram encontrados em cerca de 2 a 5% das cepas de *S. aureus* (LADHANI, 2003). Na Europa, EUA e África, a ETA é predominante e é expressa por mais de 80% das cepas produtoras dessas toxinas (AZEVEDO; ARBUTHNOTT, 1981; ADESIYUN *et al.*, 1991). Tanto a ETA quanto a ETB podem induzir a esfoliação da pele em humanos e camundongos, mesmo na ausência do patógeno, no entanto, somente no Japão as cepas produtoras de ETB são mais prevalentes do que aquelas que expressam ETA (BUKOWSKI *et al.*, 2010). Tais toxinas clivam as caderinas desmossômicas, especificamente a desmogleína 1 (Dsg1) das camadas superficiais da pele (BUKOWSKI *et al.*, 2010). Basicamente a clivagem causa uma dissociação de queratinócitos implicando na manifestação clínica SPEE. (BUKOWSKI *et al.*, 2010). Por outro lado, duas outras ETs de *S. aureus*, a ETC (UniProtKB: Q9KWG9) e a ETE (anteriormente denominada ETD-like, UniProtKB: L0RUV7), foram descobertas em isolados de fleimão de cavalo e mastite de ovelha, respectivamente, e foram capazes de causar danos à pele em modelos animais (MARIUTTI *et al.*, 2017). Já as cepas produtoras de ETD são principalmente isoladas de furúnculos e abscessos cutâneos (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Finalmente, é importante notar que, apesar de a SPEE ser tratada com sucesso na maioria dos casos com antibióticos existentes, cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos e codificadoras de ETs já foram isoladas de pacientes doentes (HISATSUNE *et al.*, 2013).

Além das ETs de *S. aureus*, essas toxinas foram descritas em outras espécies do

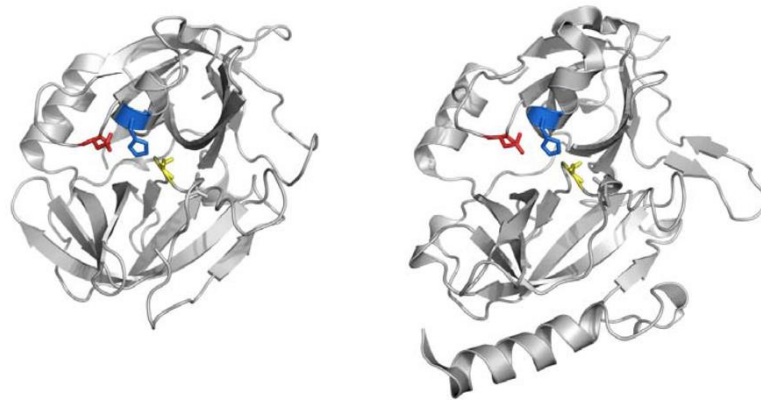
gênero *Staphylococcus*, como *S. hyicus* ExhA, ExhB, ExhC e ExhD), *S. chromogenes* (ExhB e SCET), *S. sciuri* (ExhC), *S. pseudintermedius* (ExpA ou EXI e ExpB) e *S. intermedius* (SIET), cada um com suas peculiaridades no nível de gravidade para o hospedeiro e localização gênica (MARIUTTI et al., 2017).

Entretanto, as quatro isoformas de toxinas esfoliativas produzidas por *S. aureus* (ETA, ETB, ETD e ETE) apresentam as sequências de resíduos de aminoácidos típicas de uma serino-proteinases da família das quimotripsinas (NISHIFUJI et al., 2008). Porém, apesar das sequências primárias das ETs mostrarem alta homologia entre si e com as proteínas pertencentes à família das serino-proteinases do tipo quimotripsina (SPTQs), ainda não são totalmente conhecidos os determinantes estruturais envolvidos na alta especificidade pelo substrato (Dsg-1) mostrado por essas toxinas, diferentemente à maioria das SPTQs, que são enzimas generalistas (BUKOWSKI et al., 2010). Outra característica interessante, é que os inibidores clássicos de SPTQs já testados em ETs não inibem a atividade dessas enzimas (BUKOWSKI et al., 2010).

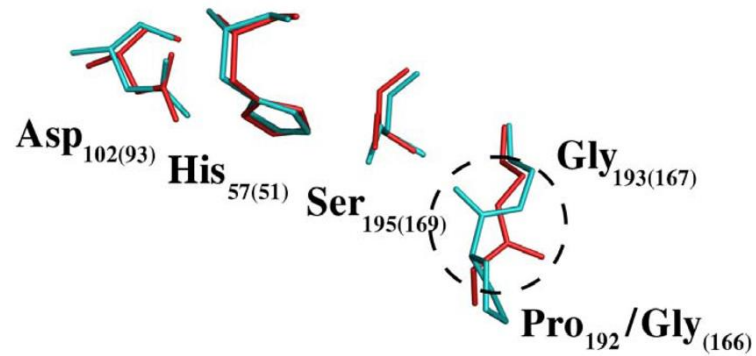
A homologia entre as ETs e as SPTQs é reforçada pelas estruturas cristalinas das ETA (PDB IDs: 1EXF, 1AGJ, 1DUE e 1DUA) ETB (PDB IDs: 1DT2 e 1QTF) e ETE (PDB IDs: 5C2Z e 8DAX). Essas estruturas revelaram também a grande similaridade dessas ETs com as glutamil-endopeptidases (GEPases) e confirmaram a presença da tríade catalítica Asp-His-Ser característica, como demonstrado na figura 1 (BUKOWSKI et al., 2010).

Figura 1. Em (A) representação em fita da estrutura cristalina da V8 protease, uma GEPase convencional (PDB: 2O8L) a esquerda, e da ETA a direita (PDB: 1EXF). Os resíduos da tríade catalítica Asp, His e Ser são representados em um modelo em bastão em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. Exceto por uma hélice adicional característica das toxinas esfoliativas e pela conformação de algumas alças superficiais, o enovelamento geral de ambas as enzimas são semelhantes. (B) A sobreposição dos resíduos da tríade catalítica da GEPase e dos resíduos correspondentes da ETA, mostrados em vermelho e azul claro, respectivamente, demonstra que esta importante parte da maquinaria catalítica está bem desenvolvida na estrutura da toxina. Por outro lado, o buraco oxianion não é pré-formado na estrutura da ETA, como demonstrado pelas diferentes orientações do oxigênio carbonílico da ligação peptídica Pro192-Gly193 na ETA e a ligação peptídica G166-G167 correspondente na glutamiledopeptidase (círculo tracejado).

A.



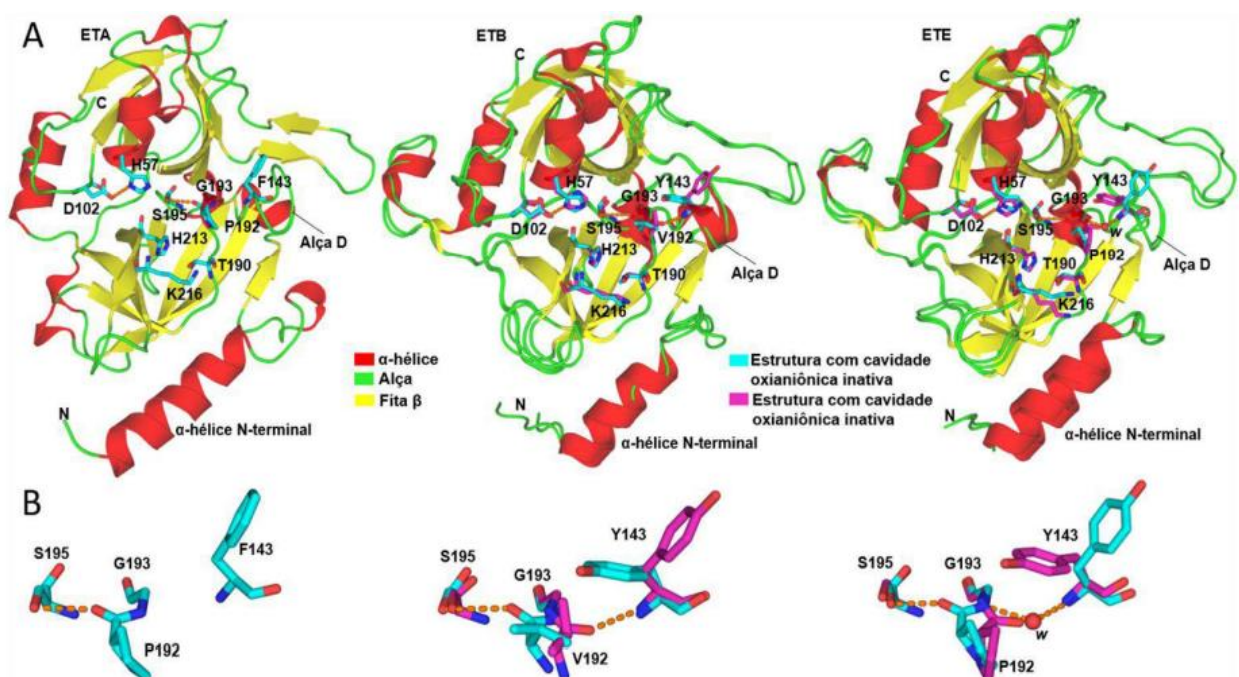
B.



Fonte: BUKOWSKI et al., 2010.

As estruturas cristalinas disponíveis das ETs também mostraram que seus bolsões S1 (Figura 2), que são os principais determinantes da especificidade pelo substrato, contêm dois elementos presentes em todas as GEPases conhecidas e que desempenham um papel central na acomodação do Glu na posição P1 do substrato: um resíduo de His na posição 213 e Thr/Ser (Thr no caso das ETs) na posição 190. Por outro lado, as ETs de *S. aureus* possuem um resíduo de Lys característico na posição 216 em vez do resíduo Ser encontrado em muitas GEPases. De fato, esse resíduo de Lys é conservado em todas as ETs conhecidas, exceto na ExhA de *S. hyicus*, que apresenta um Arg na posição equivalente. Além disso, foi proposto que o grupo amina carregado positivamente ($-NH_3^+$) de Lys216 ajuda a estabilizar o grupo carboxila de Glu-P1, um papel desempenhado pelo $-NH_3^+$ do resíduo N-terminal em outras GEPases (DEMIDYUK et al., 2017). Uma análise mutacional prévia confirmou a importância de Lys216 na atividade da ETA, já que a substituição por Ala incapacitou a enzima de hidrolisar o substrato sintético BocL-Glu-↓OPh, que de fato promoveria a atividade esterase das ETs como já relatado previamente (RAGO et al., 2000). Todas essas descobertas sugerem que Lys216 é um elemento estrutural chave para a especificidade para Glu em posição P1 (Glu-P1) e, dada a longa cadeia lateral da Lys, ela também pode impedir a ligação às ETs dos inibidores clássicos das SPTQs. No entanto, alguns autores têm argumentado, com base em considerações estruturais e funcionais envolvendo várias GEPases, que não há evidência direta sobre o papel de Lys216 na especificidade para Glu-P1, e que este resíduo pode apenas atuar como um compensador da carga negativa do Glu e afetar a catálise (DEMIDYUK et al., 2017).

Figura 2. Estruturas cristalinas das ETs. A) Representações da cadeia principal e principais resíduos envolvidos no processo de catálise da ETA (PDB: 1EXF), ETB (PDBs: 1DT2, varetas magentas e 1QTF, varetas ciano) e a ETE (PDBs: 5C2Z, varetas ciano e 8DAX, varetas magentas). As principais características estruturais dessas proteínas são mostradas: a tríade catalítica Asp102-His75-Ser195, uma α -hélice N-terminal, a presença no bolsão S1 dos resíduos Thr190, His213 e Lys216, que são cruciais para a especificidade para Glu-P1, conformações de P/V192(O) atípicas e a alça D, que acredita-se controlar a orientação de Pro192(O) na ETA. B) Representações em varetas das conformações de P/V192 (O) alternativas observadas nas estruturas cristalinas disponíveis da ETA, ETB e ETE. Em todos os casos, as linhas tracejadas laranjas representam ligações de hidrogênio (ligações H). Os resíduos são marcados de acordo com o sistema de numeração da quimotripsina. Nota-se a presença de uma molécula de água, marcada com a letra w, que forma uma ponte de água (esfera vermelha) entre Gly193(N) e Y143(N) na estrutura cristalina da ETE (PDB: 5C2Z) e que ocupa uma posição equivalente à de Pro192(O) na conformação invertida.



Fonte: GISMENE et al., 2022 .

As ETs de *S. aureus* exibem algumas outras características estruturais, que as diferenciam das serino-proteinases típicas da família das SPTQs. Na ETA, ETB e ETD há extensões alfa-hélices nas porções N e C terminais, sendo a alfa-hélice N-terminal anfipática e altamente carregada (MARIUTTI et al., 2015), uma das características estruturais mais notáveis dessas toxinas. As alças são altamente flexíveis, o que torna essas zonas susceptíveis a alterações conformacionais e de possível influência na ligação ao substrato (MARIUTTI et al., 2015). Destacam-se também os resíduos de aminoácidos envolvidos na formação da *cavidade oxianiónica*, que consiste num bolsão crucial para estabilizar a carga negativa formada em um intermediário tetraédrico durante a catálise (Figs. 2A e 2B) (DEMIDYUK, et al., 2017). Entretanto, os resultados de experimentos cristalográficos sugeriram que as ETs são

proteoliticamente inativas ou que deve existir algum tipo de mecanismo de ativação. Especulou-se imediatamente que a remoção da extensão N-terminal atípica encontrada exclusivamente em ETs, e não em outras SPQT, era a responsável. Embora vários estudos tenham sugerido a ativação proteolítica das ETs, ainda carecem de informações conclusivas (BUKOWSKI et al., 2010). No geral, até ao início do século XXI, não estava disponível nenhuma evidência direta da atividade proteolítica dos ETs e especialmente da sua associação com a esfoliação da pele, embora vários fatos favorecessem esta hipótese.

Entretanto, foi observado que, na ETA, a ligação peptídica Pro192-Gly193 se encontra invertida 180° em relação ao valor típico encontrado em outras SPTQs (VATH et al., 1997). Devido a esta conformação incomum, o oxigênio carbonílico de Pro192 aponta diretamente para o grupo -OH de Ser195 e forma uma ligação H com ele (Fig. 2B), dificultando assim o acesso de substratos à cavidade oxianiônica (VATH et al., 1997). Portanto, a ativação catalítica da ETA requer que Pro192(O) adote a conformação padrão, um processo com uma barreira energética associada de ~3 kcal/mol, de acordo com cálculos de energia livre realizados para peptídeos contendo resíduos de prolina e glicina (CAVARELLI et al., 1997). Com base em análises estruturais, Vath e colaboradores hipotetizaram que a inversão de Pro192(O) para a orientação correta poderia ser promovida por um ativador cuja identidade ainda era desconhecida naquele momento e que desencadearia uma mudança conformacional na alça D (alça 143-153, Fig. 2A) ao interagir com a α -hélice do outro extremo (VATH et al., 1997). A importância dessa α -hélice para a atividade esterolítica e funcional da ETA foi posteriormente confirmada por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* envolvendo variantes mutadas da toxina desprovidas de até os primeiros 20 resíduos N-terminais (CAVARELLI et al., 1997). Por outro lado, é importante notar que, além da conformação incomum da cavidade oxianiônica, algumas estruturas cristalinas da ETB apresentam a orientação típica de V192(O) (Fig. 2B) (BUKOWSKI et al., 2010). Da mesma forma, uma estrutura cristalina recente da ETE (PDB: 8DAX) (GISMENE et al., 2022) contém uma cópia da proteína com conformações opostas de Pro192(O) (Fig. 2B). Esses resultados sugerem a ocorrência de um equilíbrio dinâmico entre as duas conformações que, pelo menos para a ETB e a ETE, parece ser de alguma forma influenciado pelas condições de cristalização.

Outra toxina esfoliativa de interesse é a ExhC, expressa em certas cepas virulentas de *S. hyicus* e *S. sciuri*, e responsável pelas lesões cutâneas associadas à

epidermite exsudativa (EE) em suínos. Além disso, descobriu-se que ExhC induz necrose em múltiplas linhagens celulares de mamíferos, o que sugere que esta toxina pode desempenhar papéis adicionais durante infecções por *Staphylococcus*, além da esfoliação da pele (LI et al., 2011). Curiosamente, ExhC é o único ET que é conhecido por induzir necrose celular. No entanto, o papel de sua atividade necrótica *in vivo* permanece indefinido. Li et al. relataram que ExhC é um dímero em solução com base em cromatografia de exclusão de tamanho e eletroforese PAGE nativa (LI et al., 2011).

Somando-se à incerteza geral relativa ao mecanismo da atividade das ETs, foi desenvolvida outra teoria relativa ao modo de ação da toxina, simultaneamente com esforços para demonstrar a sua atividade proteolítica. Com base em informações sobre outras toxinas estafilocócicas, foi proposto que as ETs funcionam como superantígenos, proteínas que induzem a proliferação policlonal atípica de células T. De forma clássica, os antígenos processados pelas células apresentadoras de antígenos são expostos como peptídeos ligados a moléculas MHC-II e induzem seletivamente a proliferação de células T, que reconhecem especificamente o antígeno apresentado através do receptor de células T (TCR). Os superantígenos interagem diretamente com regiões invariantes do MHC-II e do TCR, induzindo a proliferação independente do antígeno de grandes populações de células T, resultando na desregulação da resposta imune (VAISHNANI, 2009). Os resultados iniciais relativos à suposta atividade superantígena dos ETs foram confusos e contraditórios. Os primeiros trabalhos de Morlock et al. e Choi et al. demonstraram a atividade mitogênica do ETA purificado a partir de sobrenadantes de culturas estafilocócicas. Foi testada a atividade em preparações de esplenócitos murinos, demonstrando que a ETA interage principalmente com células T e que sua mitogenicidade é semelhante à da enterotoxina A (MORLOCK et al., 1980). No outro estudo, ficou demonstrada a expressão elevada de uma variante específica do gene que codifica a cadeia β do TCR em células T humanas e murinas após sua interação com ETA (CHOI et al., 1989). Logo depois, outros pesquisadores sugeriram que os resultados obtidos pelos grupos de Morlock e Choi eram efeitos da contaminação da amostra com vestígios de enterotoxinas, demonstrando que a ETA recombinante isolado de cepas de *S. aureus* livres de superantígenos ou cepas de *E. coli* não tinha nenhuma atividade mitogênica quando avaliada em células mononucleares do sangue periférico humano e esplenócitos murinos. Os mesmos autores também demonstraram que a superantigenicidade de preparações comerciais das ETs poderia ser neutralizada com anticorpos direcionados

contra enterotoxinas A e B (FLEISCHER, 1992).

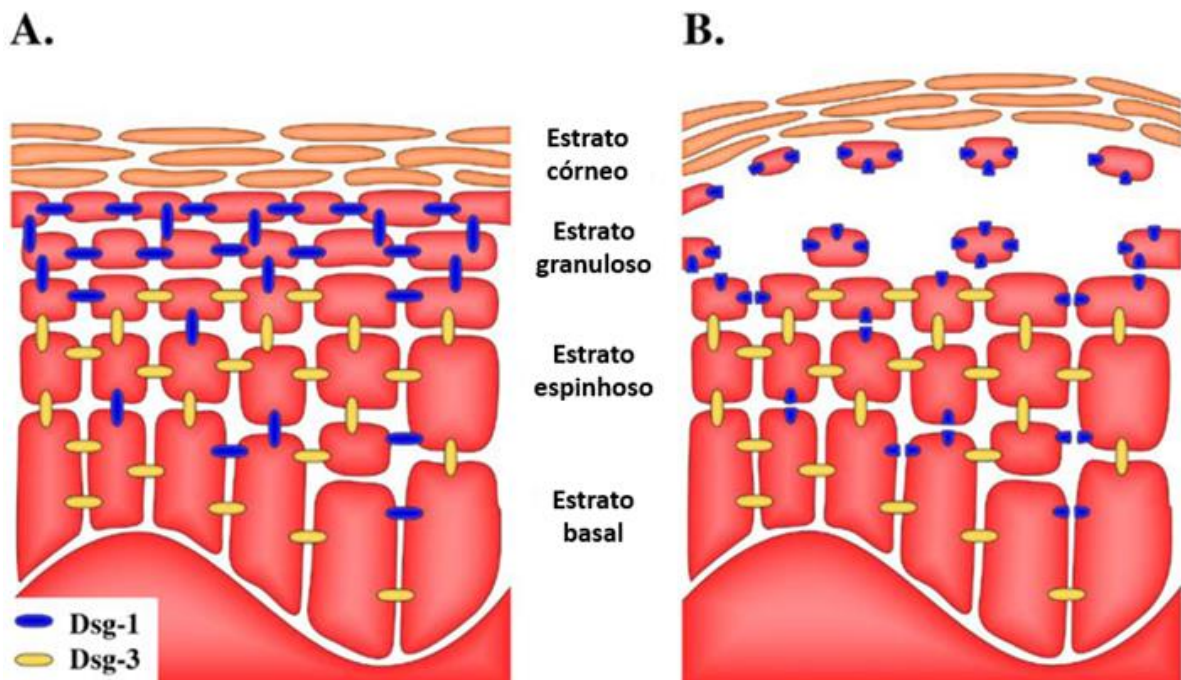
No entanto, relatórios posteriores indicaram que as ETs são verdadeiramente superantigénicos e que a sua atividade mitogénica é independente da sua atividade proteolítica. Neste sentido, foi demonstrado que tanto a toxina mutante de tipo wt quanto uma toxina proteoliticamente inativa purificada de cepas de *S. aureus* livres de superantígenos induziram a incorporação de timidina em linfócitos T humanos (VATH et al., 1997). Também, foram produzidos mutantes com atividade mitogénica modulada em outro estudo. Como exemplo mais marcante, a mutação Asp146Gly na alça D do ETA aboliu totalmente sua atividade mitogénica (RAGO et al., 2000). A atividade superantígenica de ETA e ETB altamente purificados também foi confirmada por Monday et al., que mostraram a expressão estimulada de genes específicos da cadeia β do TCR em células T humanas e esplenócitos de camundongos após tratamento com toxinas (MONDAY et al., 1999). Os mesmos autores apontaram que o ETB tinha atividade pirogénica significativamente maior do que o ETA em um modelo de coelho, onde a esfoliação não foi induzida e, portanto, os outros efeitos dos ETs poderiam ser facilmente distinguidos. No entanto, ambas as toxinas mostraram efeitos mais suaves do que o superantígeno clássico TSST-1 (MONDAY et al., 1999). Outros pesquisadores também confirmaram o efeito mitogénico significativamente menor dos ETs em comparação com os de outros superantígenos (NISHIFUJI et al., 2008). No geral, parece que se as ETs forem verdadeiramente superantigénicos (o que permanece controverso com base em evidências contraditórias), as suas propriedades mitogénicas seriam claramente mais fracas do que as de outras toxinas superantigénicas estafilocócicas. Como as lesões SPEE não mostram evidência de recrutamento de células T (LADHANI et al., 1999), a suposta superantigenicidade das ETs provavelmente não está envolvida na patogénese do SPEE.

1.3 Alvo das toxinas esfoliativas na adesão celular da pele

A epiderme, que corresponde à camada mais superficial da pele, é um tecido epitelial multiestratificado com células justapostas, as quais funcionam como uma barreira de proteção contra a invasão de micro-organismos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). A manutenção da estrutura tecidual por meio da adesão célula-célula é realizada por proteínas denominadas de desmogleínas (Dsgs) e desmocollinas (Dscs) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). As desmogleínas cruciais para a integridade da

epiderme (STANLEY; AMAGAI, 2006) possuem 4 isoformas (Dsg1 a Dsg4) descritas e apenas a Dsg1, proteína transmembrana formada por cinco ectodomínios (ECs) (Figura 3) (AOKI et al., 2005), é seletivamente reconhecida e hidrolisada pelas ETs, enquanto Dsg3 não é clivada (AMAGAI et al. 2000). Como Dsg1 é expressa em todos os estratos da epiderme e a Dsg3 é expressa apenas nos estratos espinhoso e basal (GETSIOS et al., 2004), nas camadas mais profundas da epiderme, a clivagem de Dsg1 por ETs é compensada pela presença de Dsg3, ou seja, a esfoliação ocorre apenas no estrato granuloso, onde Dsg3 não está presente (Figura 3), também indicando que a distribuição diferencial das isoformas de desmogleína (Dsg1 e Dsg3) na epiderme é induzida por ação das toxinas esfoliativas no estrato granuloso. (BUKOWSKI et al., 2010). Em todos os estratos, exceto o estrato granuloso, a hidrólise mediada por toxina esfoliativa da desmogleína 1 (Dsg1) é compensada pela desmogleína 3 (Dsg3). Dsg3 está ausente no estrato granuloso, o que explica o desprendimento celular e a divisão das camadas epidérmicas após a hidrólise de Dsg1.

Figura 3 Representação esquemática da distribuição de desmogleína em (A) pele saudável e (B) pele exposta às ETs..

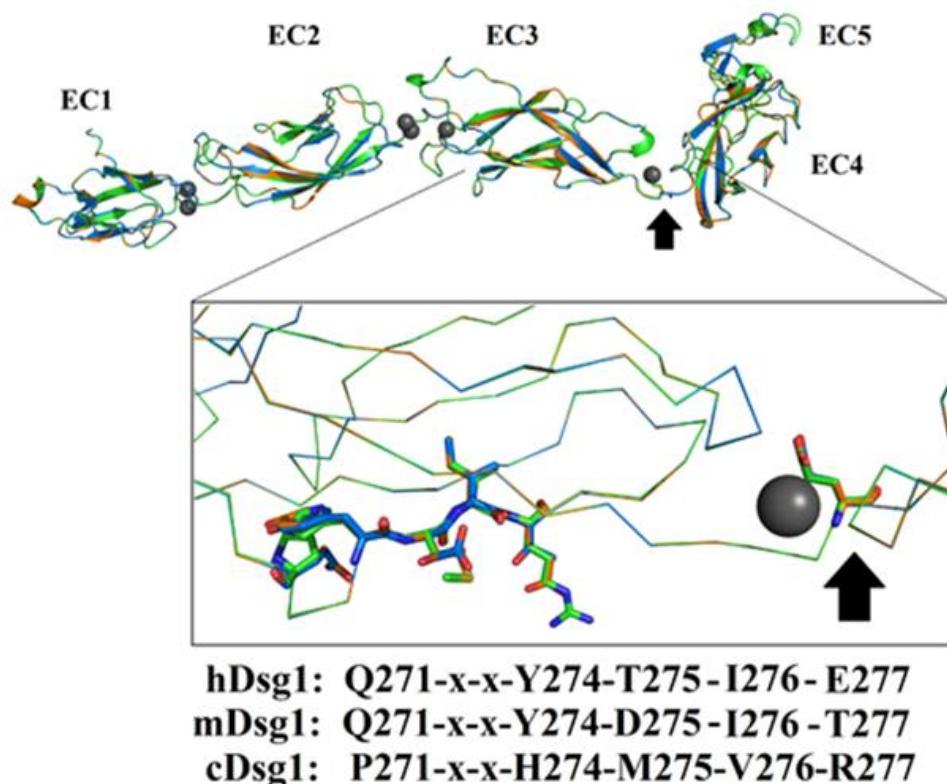


Fonte: BUKOWSKI et al., 2010.

A clivagem das Dsgs-1 pelas ETs promove desprendimento celular, característico de manifestações clínicas epidermolíticas, facilitando a propagação de

infecções microbianas (AMAGAI et al., 2002). Embora exista alta homologia estrutural entre as Dsgs1 de diferentes mamíferos, há também uma alta especificidade das ETs no reconhecimento e clivagem dos seus substratos (BUKOWSKI et al, 2010; MARIUTTI et al, 2017), o que ainda é pouco estudado e compreendido. Experimentalmente foi verificado que a ETA de *S. aureus* reconhece especificamente cinco resíduos de aminoácidos anteriores ao sítio de clivagem das Dsgs1 humana, murina e canina (Figura 4), e esses resíduos seriam cruciais para o acoplamento da enzima ao seu substrato. Entretanto, a hidrólise enzimática entre os resíduos Glu381 e G382 ocorre apenas nas Dsgs1 humana e murina, que possuem quatro resíduos de aminoácidos idênticos (HANAKAWA et al., 2004).

Figura 4. Sobreposição dos modelos estruturais indicando os 5 ectodomínios (ECs) de Dsg1 humana (laranja; hDsg1), Dsg1 canina (verde; cDsg1) e Dsg1 murina (azul; mDsg1). As esferas cinzas representam íons de cálcio e o ácido glutâmico (Glu381) do sítio de clivagem é indicado por uma seta preta. As sequências de aminoácidos da Dsg1 humana, murina e canina, 110 resíduos a montante do sítio de clivagem, estão destacadas. A letra x indica resíduos de aminoácidos das Dsgs1 considerados não cruciais para o reconhecimento e clivagem das Dsgs1 pela ETA.



Fonte: MARIUTTI et al., 2017.

As propriedades mencionadas anteriormente foram críticas para avaliar a influência das regiões distais da Dsg-1 na clivagem proteolítica. Hanakawa e colaboradores demonstraram que a atividade da ETA independe de os domínios EC4 e EC5 serem intactos ou não. Além disso, os autores mostraram que a substituição de cinco resíduos do domínio EC3 da Dsg-1 canina, localizados 110 resíduos antes do local de clivagem em direção ao extremo amino, por aqueles em posições equivalentes da hDsg-1 foi suficiente para promover a hidrólise (HANAKAWA et al., 2004). Portanto, é provável que a região que contém esses resíduos atue como um local de reconhecimento crítico, permitindo o posicionamento correto e/ou a ativação da ETA. Dancer e colaboradores relataram em 1990 que a pré-incubação da ETA com fenilmetilsulfonil fluoreto e diisopropilfluorofosfato, inibidores de largo espectro das SPTQs, não preveniu a esfoliação epidérmica em camundongos após administração subcutânea. No entanto, o aparecimento dos primeiros sinais de epidermólise após a inoculação da ETA foi atrasado na presença desses inibidores (DANCER et al., 1990). Como a enzima é ativada *in situ* após sua interação com a mDsg-1, há possibilidade de que os inibidores acessem a cavidade oxianiónica formada previamente, sendo assim, pode ser interpretados como dados que apoiam a necessidade da ativação prévia da cavidade oxianiónica da ETA para deixar a enzima suscetível à inibição. De fato, como a enzima é ativada *in situ* após sua interação com a mDsg-1, há uma possibilidade, ainda que pequena, de que os inibidores acessem a cavidade oxianiónica corretamente formada (DANCER et al., 1990). Isso, por sua vez, sugere que misturas de inibidores e ativadores podem reduzir a atividade proteolítica de ETs de forma mais eficiente (DANCER et al., 1990). Portanto, a compreensão aprofundada do mecanismo de ativação das ETs é necessária para planejar moléculas capazes de promover a inversão da orientação de P/V192(O) antes da ligação do inibidor (DANCER et al., 1990). Entretanto, as bases moleculares para a alta especificidade das ETs permanecem incompreendidas, dada não só à falta de informações estruturais sobre a interação dessas enzimas com os ligantes do sítio ativo, mas também, e principalmente, com seu substrato natural, a Dsg1.

1.4 Potenciais inibidores da atividade esfoliativa das toxinas

A combinação de técnicas computacionais com experimentos cuidadosamente planejados podem auxiliar na compreensão mais detalhada da regulação complexa

ETs em escala molecular, elucidando possíveis caminhos no desenho de inibidores da atividade esfoliativa. Em estudos recentes, ficou demonstrado que o peptídeo hormônio estimulante de beta-melanócitos (beta-MSH) é clivado por ETA e que tanto ETA quanto ETB são capazes de clivar alfa-MSH. Ambas as toxinas exibem clivagem em resíduos específicos de ácido glutâmico em peptídeos MSH (RAGO et al., 2000).

Inspirado nesse estudo, foram testados no nosso grupo dois peptídeos, alpha-MSH e alpha-MSH com o glutâmico invertido (L->D), o intuito de inverter a configuração do Glu-P1 foi tornar o peptídeo resistente à hidrólise e portanto um inibidor. Além disso, outra família de potenciais inibidores, agora de natureza orgânica, também foram testados previamente *in silico* e, os mais promissores, foram sintetizados e adquiridos para os testes inibição da atividade enzimática.

Ainda, o presente trabalho também trouxe resultados de possíveis ligantes peptídicos, selecionados *in vitro* por afinidade ao alvo (as toxinas esfoliativas), através de uma técnica de exibição de fagos, do inglês "Phage Display", que consiste na seleção de peptídeos a partir de uma biblioteca de fagos (New England Biolabs Inc.) que apresentam na parte externa do fago uma sequência de 7 aminoácidos aleatórios, enquanto o material genético que codifica cada variante reside no interior (CLACKSON; LOWMAN, 2004). Desse modo, cria-se uma ligação física entre cada peptídeo e a variante sequência de DNA que a codifica. Sendo assim, através de um processo de seleção *in vitro* chamado panning (CLACKSON; LOWMAN, 2004), é possível realizar o particionamento rápido com base na afinidade de ligação às ETs de *Staphylococcus aureus*. Em resumo, é possível que os ligantes peptídicos sejam selecionados por afinidade aos alvos e posteriormente identificados, fornecendo assim informação para o desenho de peptídeos mais eficientes na interação e ou inibição do potencial esfoliativo dessas toxinas.

Na literatura, já ficou demonstrado por experimentos utilizando produtos da New England Biolabs, que a identificação de sequências peptídicas contra uma variedade de proteínas, incluindo enzimas, receptores de superfície celular e anticorpos monoclonais, pode ser executada utilizando as diversas bibliotecas de fagos disponíveis. O sistema tem sido usado para inúmeras aplicações, incluindo mapeamento de epítomos (PETERS et al., 1994; ROWLEY et al., 2000), peptídeos antimicrobianos/virais (DIELTJENS et al., 2010), peptídeos específicos de material (SAWADA et al., 2009), aglutinantes de moléculas pequenas (SCHWEMMER et al., 2012; ZHAO, 2005) e novos substratos enzimáticos (SUGIMURA et al., 2006). As

bibliotecas de fagos têm sido amplamente utilizadas para a descoberta de peptídeos bioativos por meio de abordagens de seleção *in vitro* e *in vivo* (KELLY et al., 2008). Todavia, a prospecção de possíveis moléculas inibidoras do potencial esfoliativo das ETs, seja por meio da técnica Phage Display ou por Dinâmica Molecular (MD), pode direcionar estratégias para mitigar os efeitos epidermiolíticos das toxinas esfoliativas de *Staphylococcus aureus*.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados, podemos concluir que o processo de transformação, expressão e purificação das proteínas ETA, ETE e ExhC wt fora um sucesso. E, as técnicas empregadas nos testes *in silico* e *in vitro* de potenciais inibidores das ETs, foram promissoras. Agora, os dados servirão de base para futuros estudos *in vivo*. *Enquanto que*, a bioprospecção de possíveis peptídeos de alta afinidade ao alvo (ETA) através da técnica “Phage Display”, também, promoveram sequências peptídicas de alta afinidade ao alvo. Desse modo, o estudo *in silico* de peptídeos potencialmente inibidores da ação esfoliativa, se configurou como uma base norteadora embasada em dados empíricos. Assim, acredita-se que com esse respaldo, às decisões de quais serão os próximos peptídeos a serem comprados e testados *in vivo*, nos próximos estudos, terão chances de serem assertivas enquanto a interação com as ETs.

Com respaldo da literatura, a cristalização da proteína ETA wt foi bem sucedida. Agora, buscamos a co-cristalização das ETs com os ligantes, tanto os carbônicos como os peptídicos (o que seria um resultado inédito na literatura). Desse modo, novos protocolos de cristalização estão sendo realizados para encontrar a condição ideal de co-cristalização dessas proteínas com tais ligantes promissores. Resultados positivos na determinação de sua estrutura cristalográfica associada a um ligante podem proporcionar informações acerca do mecanismo fino de acomodação dos peptídeos nos sítios ativos das toxinas e/ou sítios secundários moduladores, e assim, possibilitando a extração de informações valiosas para a descoberta de novos inibidores, bem como, a elucidação dos mecanismos moleculares da ação esfoliativa, que ainda carecem de dados conclusivos.

REFERÊNCIAS

- ADESIYUN, A. A., LENZ, W., SCHAAL, K. P. Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and human beings in Nigeria. **Microbiol.**, v. 14, p. 357–362, 1991.
- AHRENS, P., ANDRESEN, L. O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. **J. Bacteriol.**, v. 25, p. 1833–1837, 2004.
- ALVES, P. D. D., et al. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. **Vet. Microbiol.**, v. 137, p. 190–195, 2009.
- AMAGAI, M., et al. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. **JID.**, v.118, n. 5, p. 845-850, 2002
- AMAGAI, M., et al. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein-1. **Nat. Med.**, v. 6, p. 1275-1277, 2000.
- AOKI, V., RIVITTI, E. A., ITO, L. M., HANS-FILHO, G., DIAZ, L. A. **Historical profile of the immunopathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n. 3, p. 287-92, 2005.
- AZAVEDO, J., ARBUTHNOTT, J. P. Prevalence of epidermolytic toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 14, p. 341–344, 1981.
- BUKOWSKI, M., WLADYKA, B., DUBIN, G., Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 1148-1165, 2010.
- CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J.**

Pediatr., v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CAVALCANTI, S. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 56- 63, 2005.

CAVARELLI, J., *et al.* The Structure of *Staphylococcus aureus* Epidermolytic Toxin a, an Atypic Serine Protease, at 1.7 Å Resolution. **Struct.**, v. 5, p. 813-824, 1997.

CHESNEAU O., *et al.* *Staphylococcus pasteurii* sp. Nov. Isolated from human, animal, and food specimens. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v 43, p. 237-44, 1993.

CHOI, Y. W., *et al.* Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 8941–8945, 1989.

CLACKSON T., LOWMAN H. B. Phage Display: a practical approach. **Oxford University Press, Inc., New York**, 2004.

COUTO, I., SANTOS S. I., SA-LEÃO R., DE LENCASTRE, H. Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1136–1143, 2000.

CRIBIER, B., PIEMONT, Y., GROSSHANS, E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. A clinical review illustrated with a new case. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 30, p. 319–324, 1994.

DAKIC, I., *et al.* S. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. **J. Clin.**, v. 43, n. 6, p. 2782–2785, 2005.

DANCER, S. J., *et al.* The Epidermolytic Toxins Are Serine Proteases. **FEBS Lett.**, v. 268, p. 129-132, 1990.

DEMIDYUK, I. V., CHUKHONTSEVA, K. N., KOSTROV, S. V. Glutamyl Endopeptidases: The Puzzle of Substrate Specificity. **Acta Nat.**, v. 9, p. 17-33, 2017.

DIELTJENS, T., et al. Unravelling the antigenic landscape of the HIV-1 subtype A envelope of an individual with broad cross-neutralizing antibodies using phage display peptide libraries. **J. Virol. Meth.**, v. 169, p. 95–102, 2010.

DOTI N., MARDIROSSIAN M., SANDOMENICO A., RUVO M., CAPORALE A. Recent Applications of Retro-Inverso Peptides. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 16, p. 8677, 2021.

PESSOA, F. Poema X Mar Português. **Edições Ática: Lisboa**, p. 16. 1959.

FLEISCHER, B., BAILEY, C. J. Recombinant epidermolytic (exfoliative) toxin A of *Staphylococcus aureus* is not a superantigen. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 180, p. 273–278, 1992.

GETSIOS, S., HUEN, A. C., GREEN, K. J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 4, p. 271, 2004.

GENHEDEN S., RYDE U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods for estimating ligand binding affinities. **Specialist Opin Drug Discv.**, v. 10, n. 5, p. 449-61, 2015.

GIAMMARINARO P., et al. Development of a new oligonucleotide array to identify *Staphylococcal* strains at species level. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2, n. 43, p. 3673-80, 2005.

GISMENE, C., et al. *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxin E, Oligomeric State and P186 Flip: Implications for its Mechanism of Action. **Int. J. Mol. science**, v. 23, p. 9857, 2022.

HANAKAWA, Y., et al. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. **J. Biological Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5268-5277, 2004.

HANES, C. S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration on the rate of hydrolysis by amylase from sprouted barley. **Biochem. J.**, v. 26, p. 1406–1421, 1932.

HISATSUNE, J., et al. Emergence of *Staphylococcus aureus* Carrying Multiple Drug Resistance Genes on a Plasmid Encoding Exfoliative Toxin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 6131-6140, 2013.

IWATSUKI, K. et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **J. Dermatol Sci.**, v. 42, p. 203-14, 2006.

JOHNSON, W. M., et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 426–430, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2018.

KELLY, K. A., BARDEESY, N., ANBAZHAGAN, R. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. **PLoS Med.**, v. 5, p. 657–668, 2008.

LADHANI, S., et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrom. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 224–242, 1999.

LADHANI, S. Understanding the Mechanism of Action of the Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 181-189, 2003.

LEE, C. Y., et al. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 3, p. 3904–3909, 1987.

LI H., WANG Y., DING L., ZHENG S. J. A toxina esfoliativa C de *Staphylococcus sciuri* (ExhC) é um indutor de necrose para células de mamíferos. **PLoS Um**, v. 6, n. 7, p. 23145, 2011.

LYELL, A. A review of toxic epidermal necrolysis in Britain. **J. Dermatol.**, v. 79, p. 662–

671, 1967.

MARIUTTI, R. B., et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin D-like protein: Structural basis for the high specificity of exfoliative toxins. **Biochem. Biophys. Research Communications**, v. 467, n. 1, p. 171-177, 2015.

MARIUTTI, R. B. et al Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*, p.127–143. In **Enany, S., Crotty Alexander, L. E.** The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. InTec, 2017.

MELISH, M. E., GLASGOW, L. A. The staphylococcal scalded-skin syndrome: development of an experimental model. **N. E. J. M.**, v. 282, n. 20, p. 1114-1119, 1970.

MELISH, M. E., GLASGOW, L. A., TURNER, M. D. The staphylococcal scalded-skin syndrome: isolation and partial characterization of the exfoliative toxin. **J. Infect. Dis.**, v.125, p. 129–140, 1972.

MILLER, B. R., et al. AE MMPBSA.py: An efficient program for final state free energy calculations. **J. Chem. Theoretical computation**, v. 8, p. 3314–3321, 2012.

MONDAY, S.R., et al. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4550–4559, 1999.

MORLOCK, B. A., SPERO, L., JOHNSON, A. D. Mitogenic activity of staphylococcal exfoliative toxin. **Infect. Immun.**, v. 30, p. 381–384, 1980.

MURRAY P. R. **Microbiologia Médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier**, 2009.

NISHIFUJI, K., SUGAI, M., AMAGAI, M. Staphylococcal exfoliative toxins: “Molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **J. Dermatol. Sci.**, v. 49, p. 21–31, 2008.

NOGUCHI, N ., et al. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2119–2125, 2006.

PETERS, E. A., et al. Membrane insertion defects caused by positive charges in the early mature region of protein pIII of filamentous phage fd can be corrected by prfA suppressors. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4296–4305, 1994.

RAGO, J. V. et al. Mutational analysis of the superantigen staphylococcal exfoliative toxin A (ETA). **J. Immunol.**, v. 164, p. 2207–2213, 2000.

RAGO J. V., et al. Staphylococcal exfoliative toxins cleave alpha- and beta-melanocyte-stimulating hormones. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 4, p. 2366, 2000.

ROWLEY, M. J., SCEALY, M., WHISSTOCK, J. C., JOIS, J. A., WIJEYEWICKREMA, L. C. AND MACKAY, I. R. Identification of conformational epitopes for human IgG on Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3413–3419, 2000.

SAKURAI, S., SUZUKI, H., MACHIDA, K. Rapid identification by polymerase chain reaction of staphylococcal exfoliative toxin serotype A and B genes. **Microbiol. Immunol.**, v. 39, p. 379–386, 1995.

SANTOS, A. L., et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar , **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHWEMMER, T. et al. Peptide-Mediated Nanoengineering of Inorganic Particle Surfaces: A General Route toward Surface Functionalization via Peptide Adhesion Domains. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 134, p. 2385–2391, 2012.

STANLEY, J. R., AMAGAI, M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. **N. E. J. M.**, v. 355, n. 17, p. 1800-1810, 2006.

SAWADA, T. et al. Affinity-Based Screening of Peptides Recognizing Assembly States of Self-Assembling Peptide Nanomaterials **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 131, p. 14434–14441, 2009.

SUGIMURA, Y., et al. Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 17699–17706, 2006.

VAISHNANI, J. Superantigen. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 75, p. 540–544, 2009.

VATH, G. M., et al. The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease. **Biochem.**, v. 36, p. 1559–1566, 1997.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

VON RITTERSHAIN, G. R. Die exfoliative dermatitis jugener senglunge. **Z. Kinderheilkd**, v. 2, p. 3–23, 1878.

WATERHOUSE, A., et al. Swiss-Model: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. **Nucleic Acids Res.**, v. 46, p. 296-303, 2018.

YAMAGUCHI, T., et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **IAI**, v. 70, p. 5835-5845, 2002.

YAMAGUCHI, T., et al. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1511–1516, 2002.

ZHAO, S. W. Selecting peptide ligands of microcystin-LR from phage displayed random libraries. **Environ. Int.**, v. 31, p. 535–541, 2005.