

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Instituto de Química – Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

RODOLFO DOS SANTOS CARRIJO

**Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de
Salmonella enterica e de peptídeos sintéticos derivados com
potencial capacidade de interação com membranas biológicas**

ARARAQUARA

2018

RODOLFO DOS SANTOS CARRIJO

**Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de
Salmonella enterica e de peptídeos sintéticos derivados com
potencial capacidade de interação com membranas biológicas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Bertucci
Barbosa

ARARAQUARA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

C316c Carrijo, Rodolfo dos Santos
Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de *Salmonella enterica* e de peptídeos sintéticos derivados com potencial capacidade de interação com membranas biológicas / Rodolfo dos Santos Carrijo. – Araraquara : [s.n.], 2018
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Reinaldo Marchetto
Coorientador: Luiz Carlos Bertucci Barbosa

1. Antibacterianos. 2. Membranas celulares. 3. Toxinas bacterianas. 4. *Salmonella*. 5. Bactericidas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

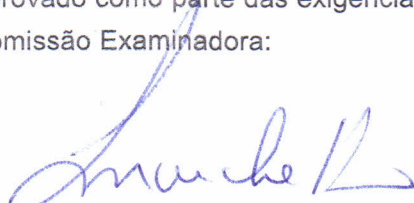
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de *Salmonella enterica* e de peptídeos sintéticos derivados com potencial capacidade de interação com membranas biológicas"

AUTOR: RODOLFO DOS SANTOS CARRIJO

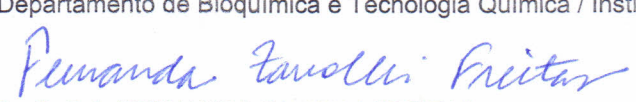
ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

COORIENTADOR: LUIZ CARLOS BERTUCCI BARBOSA

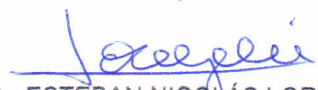
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. FERNANDA ZANOLLI FREITAS

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.Dr. ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Instituto de Ciências Biológicas - UFG - Goiânia

Araraquara, 05 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

Rodolfo dos Santos Carrijo

Curriculum vitae

Dados pessoais

Nome: Rodolfo dos Santos Carrijo

Nome em citações bibliográficas: CARRIJO, R. S.;

Endereço eletrônico: rodolfo_carrijo@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2016 - Atual

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brasil. Título: Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de *Salmonella enterica* e de peptídeos sintéticos derivados com potencial capacidade de interação com membranas biológicas. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Bertucci Barbosa. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

2011 - 2016

Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins, Brasil. Título: Determinação da concentração ótima de meio de cultura para a microalga *Spirogyra* sp. e de possíveis crioprotetores para sua conservação. Orientador: Prof. Dr. Taciano Peres Ferreira.

Formação complementar

2017 - 2017

A Química Verde na Indústria Farmacêutica (Carga horária: 2h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2017 - 2017

Mecanismos de Reparo de DNA em Câncer (Carga horária: 2h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2017 - 2017

Terapia Baseada em Anticorpos (Carga horária: 2h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2017 - 2017

Triagem de Alto Desempenho para a Descoberta de Novos Fármacos (Carga horária: 2h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - 2016

Operação e Manutenção Básica no Sistema HPLC *Shimadzu* (Carga horária: 12h).

Shimadzu do Brasil Comércio, SBC, Brasil.

2015 - 2015

Sistemas de Liberação de Fármacos e Biomoléculas (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2015 - 2015

Ciência e Tecnologia (Carga horária: 15h).

Fundação Getúlio Vargas, FGV, Brasil.

2015 - 2015

Conhecimento, Saber e Ciência (Carga horária: 5h).

Fundação Getúlio Vargas, FGV, Brasil.

2015 - 2015

Relevância das Questões Ambientais (Carga horária: 5h).

Fundação Getúlio Vargas, FGV, Brasil.

2015 - 2015

Agroquímicos: Importância, aplicações e preparação (Carga horária: 4h).

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

2015 - 2015

Estágio, Lab. Biotecnologia Molecular (Carga horária: 22h).

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

2014 - 2014

Desenho de *Primers* (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 - 2014

Extração de RNA (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 - 2014

Seleção de Microrganismos Biorremediadores (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 - 2014

Análise da Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Carga horária: 12h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 - 2014

Bioinformática Aplicada à Biotecnologia (Carga horária: 4h).

Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

2014 - 2014

Investigação em Toxicologia Pré-clínica (Carga horária: 4h).

Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

2013 - 2014

Estágio, Lab. Vacinologia (Carga horária: 360h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2011 - 2012

Estágio, Lab. Manejo Integrado de Pragas (Carga horária: 120h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2011 - 2011

Processamento de Frutas (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2011 - 2011

Processos Químicos Industriais (Carga horária: 4h).

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

2016 - 2018

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: mestrando.

2016 - 2017

Vínculo: representante discente;

Enquadramento funcional: comissão de ética ambiental.

2016 - 2017

Vínculo: representante discente;

Enquadramento funcional: comissão da biblioteca.

2. Universidade Federal do Tocantins – UFT

2015 - 2015

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitor da disciplina Bioquímica Geral, sob a orientação do professor Márcio dos Santos Teixeira Pinto.

2014 - 2015

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitor da disciplina Microbiologia Geral, sob a orientação do professor Alex Fernando de Almeida.

2014 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: programa de iniciação científica.

Título: Identificação, caracterização e seleção de microalgas no Estado do Tocantins.

2014 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: programa institucional de bolsas de extensão.

Título: Coleta de óleo de fritura para produção de biodiesel: uma ferramenta para educação ambiental em instituições de ensino médio de Gurupi-TO.

2014 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: monitor da disciplina Bioquímica Geral, sob a orientação da professora Aurenívia Bonifácio de Lima.

2014 - 2014

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitor da disciplina Microbiologia Geral, sob a orientação do professor Alex Fernando de Almeida.

2013 - 2014

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: programa institucional de bolsas de extensão.

Título: Coleta de óleo de fritura para produção de biodiesel: uma ferramenta para educação ambiental em instituições de ensino médio de Gurupi-TO.

2013 - 2014

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estagiário. Estágio voluntário no laboratório de Vacinologia (UFT - campus Gurupi), sob a orientação do professor Alex Sander Rodrigues Cangussu.

2012 - 2012

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitor da disciplina Química Orgânica, sob a orientação da professora Juliana Cristina Holzbach.

2011 - 2012

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estagiário. Estágio voluntário no laboratório de Manejo Integrado de Pragas (UFT - campus Gurupi), sob a orientação do professor Raimundo Wagner de Souza Aguiar.

Projetos

2016 - Atual

Título: Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de *Salmonella enterica* e avaliação da sua participação no fenômeno de persistência celular bacteriano.

Descrição: o sistema toxina-antitoxina tipo V, foi caracterizado com base nos estudos sobre o sistema GhoT/GhoS, onde a GhoS é uma antitoxina com atividade de RNase que degrada o mRNA da toxina GhoT em um sítio específico rico em resíduos de uridina e adenosina, desta forma, inibindo a sua síntese. Já a toxina GhoT corresponde a uma pequena proteína (peptídeo), altamente hidrofóbica, com dois domínios transmembrana preditos, atuando na formação de células fantasmas (células com membranas danificadas) e no fenômeno de persistência celular. No entanto, embora a antitoxina GhoS tenha sido bem caracterizada, a função da toxina GhoT não foi ainda totalmente esclarecida, sendo apenas predito que a mesma age sobre a membrana plasmática, formando poros. Além disso, por exemplo, não se sabe se sua integração à membrana é reversível e como sua atividade está ligada à formação de células persistentes.

Situação: em andamento;

Natureza: pesquisa.

Integrantes: Rodolfo dos Santos Carrijo – Integrante / Luiz Carlos Bertucci Barbosa – Integrante / Reinaldo Marchetto - Coordenador.

2014 – 2015

Título: Identificação, caracterização e seleção de microalgas no estado do Tocantins.

Descrição: nos últimos anos, os estudos relacionados ao uso de microalgas para a produção de biocombustíveis vêm ganhando espaço, sendo estes motivados em especial pelas diversas problemáticas encontradas na utilização de culturas agrícolas convencionais para o mesmo fim. Além de não competirem com a produção de alimentos, as microalgas apresentam como principais vantagens o rápido crescimento, a elevada capacidade de produzir e armazenar óleos e carboidratos, e a necessidade de menores áreas e quantidades de água para o seu cultivo. O presente trabalho tem por objetivo o isolamento e cultivo de microalgas do estado do Tocantins, com a finalidade de produzir biocombustíveis.

Situação: concluído;

Natureza: pesquisa.

Integrantes: Rodolfo dos Santos Carrijo – Integrante / Dallecyo Cerqueira Lopes – Integrante / Taciano Peres Ferreira - Coordenador.

2013 - 2014

Título: Determinação da atividade enzimática de poligalacturonase por isolados fúngicos.

Descrição: as enzimas têm ampla aplicação industrial como na conversão de alimentos, na produção farmacêutica de medicamentos, vitaminas, e hormônios, na indústria de couro, detergentes, têxtil e na gestão de resíduos industriais, sendo obtidas de microrganismos, desde bactérias, leveduras e principalmente por fungos filamentosos. Este trabalho visa obter

essas biomoléculas a partir de fungos filamentosos e proporcionar a caracterização da atividade enzimática de poligalacturonase desses isolados fúngicos obtidos de cultivo em substrato sólido constituído de milho, arroz e soja visando futura utilização como componente de rações de animais.

Situação: concluído;

Natureza: pesquisa.

Integrantes: Rodolfo dos Santos Carrijo – Integrante / Mellanie Karoline do Carmo Félix – Integrante / Alex Sander Rodrigues Cangussu - Coordenador.

Projetos de extensão

2013 - 2015

Título: Coleta de óleo de fritura para produção de biodiesel: uma ferramenta para educação ambiental em instituições de ensino médio de Gurupi – TO.

Descrição: esse trabalho teve como aspecto fundamental promover a educação ambiental por meio de seminários e oficinas de produção, em instituições de ensino médio da cidade de Gurupi - TO, ressaltando a importância do reaproveitamento dos óleos residuais de fritura (ORF), contribuindo para evitar os impactos e degradação ao meio ambiente causada por esses resíduos, além de apresentar o grande potencial dos mesmos como matéria prima para a produção de biodiesel.

Situação: concluído;

Natureza: extensão.

Integrantes: Rodolfo dos Santos Carrijo – Integrante / Mayra Fonseca Costa – Integrante / Dallecyo Cerqueira Lopes – Integrante / Taciano Peres Ferreira Coordenador.

Idiomas

Português

Compreende bem; Fala bem; Lê bem; Escreve bem.

Espanhol

Compreende razoavelmente; Fala pouco; Lê razoavelmente; Escreve pouco.

Inglês

Compreende razoavelmente; Fala pouco; Lê razoavelmente; Escreve pouco.

Prêmios e títulos

2017

1º Lugar entre os trabalhos apresentados na forma de painel no VII Congresso Farmacêutico da UNESP, com o trabalho intitulado Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

2015

Menção Honrosa na Área de Ciências Exatas e da Terra no XI Seminário de Iniciação Científica da UFT, com o trabalho Identificação, Caracterização e Seleção de Microalgas no Estado do Tocantins, Fundação Universidade Federal do Tocantins.

Produções

1. Artigos completos publicados em periódicos

CARRIJO, R. S.; LOPES, D. C. ; BARBOSA, L. C. B. ; FERREIRA, T. P. Determinação da Concentração Ótima de Meio de Cultura para a Microalga *Spirogyra sp.* e de Possíveis Crioprotetores para a sua Conservação. Revista Eletrônica de Energia, v. 6, p. 38, 2016.

CARRIJO, R. S.; SILVA, V.C.F. ; SANTOS, A. C. M. ; COSTA, M. F. ; FERREIRA, T. P. Uso de Microalgas para a Produção de Biodiesel: Vantagens e Limitações. Revista Eletrônica de Energia, v. 5, p. 23-31, 2015.

2. Capítulos de Livros

BARBOSA, L. C. B.; **CARRIJO, R. S.** Protein Structure Prediction Using Molecular Homology Modeling. In: Azat Mukhametov. (Org.). Software and Techniques for Bio-Molecular Modelling. 1ed.New Jersey: Austin Publishing Group, 2016, v. 1, p. 48-57.

3. Resumos publicados em anais de eventos

CARRIJO, R. S.; CONCEICAO, M. B. ; ROCHA, C. A. ; CRUSCA, E. ; MARCHETTO, R. ; BARBOSA, L. C. B. Structure and possible function of *Salmonella enterica* GhoT protein. In: 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Congresso SBBQ.

CONCEICAO, M. B.; **CARRIJO, R. S.**; AZEVEDO, T. B.; MARCHETTO, R.; CRUSCA, E. Structure-function relationship of antimicrobial synthetic peptides analogs of pantinin-3. In: 46° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Congresso SBBQ.

ROCHA, C. A.; CRUSCA, E.; **CARRIJO, R. S.**; MARCHETTO, R. Effects of dimerization on the biological activity of the WRWYCRCK peptide. In: 46° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. Congresso SBBQ.

CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A. ; CONCEICAO, M. B. ; SANCHES, B. C. P. ; BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. In: VII Congresso Farmacêutico da UNESP, 2017, Araraquara. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2017.

CARRIJO, R. S.; FERREIRA, T. P.; AGUIAR, R.W.S.; LOPES, D. C. Identificação e caracterização de microalgas no estado do Tocantins. In: I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia, 2015, Palmas - TO. I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, 2015.

CARRIJO, R. S.; FERREIRA, T. P.; AGUIAR, R.W.S.; LOPES, D. C. Determinação da concentração de meio de cultura ideal para o crescimento da microalga *Spirogyra* sp. In: I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia, 2015, Palmas - TO. I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, 2015.

FERREIRA, T. P.; **CARRIJO, R. S.**; AGUIAR, R.W.S.; LOPES, D. C. Otimização da produção de *Spirogyra* sp. do Estado do Tocantins, com ênfase na produção de biocombustíveis. In: I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia, 2015, Palmas - TO. I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, 2015.

FERREIRA, T. P.; **CARRIJO, R. S.**; AGUIAR, R.W.S.; LOPES, D. C. Produção da microalga *Spirogyra* sp. do Estado do Tocantins, com ênfase na produção de biocombustíveis. In: I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia, 2015, Palmas - TO. I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, 2015.

BARBOSA, L. C. B.; **CARRIJO, R. S.**; GARRIDO, S.S.; MARCHETTO, R. A comprehensive database of protein structural data on toxin-antitoxin systems: a target for developing antimicrobial agents. In: IV International Symposium on Drug Discovery, 2015, Araraquara -

SP. In the IV International Symposium on Drug Discovery, Araraquara, Brazil, July, 22nd- 24th, 2015, 2015.

CARRIJO, R. S.; FERREIRA, T. P.; LOPES, D. C. ; BARBOSA, L. C. B. ; AGUIAR, R.W.S. . Isolamento e Determinação da Concentração Ótima de Meio de Cultura para o Desenvolvimento da Microalga *Spirogyra* sp. In: V Jornada de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, 2015, Viçosa - MG. Universidade Federal de Viçosa, 2015.

CARRIJO, R. S.; LOPES, D. C. ; BARBOSA, L. C. B. ; FERREIRA, T. P. Determinação de Possíveis Crioprotetores para a Conservação da Microalga *Spirogyra* sp. In: Semana Acadêmica Integrada de Biotecnologia e Química, 2015, Gurupi - TO. Fundação Universidade Federal do Tocantins, 2015.

JESUS, L.F.; ALMEIDA, S.G.C.; FELIX, M. K. C.; **CARRIJO, R. S.**; AGUIAR, R.W.S.; BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, A. S. R. Seleção de fungos filamentosos com atividade de poligalacturonase. In: I Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015, Araraquara - SP. I Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), 2015.

COSTA, M. F.; FERREIRA, T. P.; **CARRIJO, R. S.**; LOPES, D. C. Coleta de óleo de fritura para produção de biodiesel: conscientização e reciclagem em instituições de ensino médio de Gurupi - TO. In: 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN. SBQ, 2014.

SILVA, S. M. O.; **CARRIJO, R. S.**; PEREIRA, V. S.; SILVA, L. A.; SANTOS, A. F. Análise do crescimento inicial das mudas de *Parkia pendula* (Fava de bolota), em diferentes substratos para fins de arborização. In: XVII Congresso Brasileiro de Arborização Urbana, 2013, Palmas - TO. Congresso Brasileiro de Arborização Urbana, 2013.

4. Apresentações de trabalhos

CARRIJO, R. S. Avaliação do Efeito Antibiofilme de Diferentes Compostos. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CARRIJO, R. S.; FERREIRA, T. P. Identificação, caracterização e seleção de microalgas no estado do Tocantins. 2015. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

5. Outras produções bibliográficas

CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A.; CONCEICAO, M. B.; SANCHES, B. C. P.; BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 38 Supl. 1, agosto, 2017 (Resumo).

SANCHES, B. C. P.; **CARRIJO, R. S.**; ROCHA, C. A.; AZEVEDO, T. B.; CONCEICAO, M. B.; MARCHETTO, R. Internalização de peptídeos inibidores de topoisomerasas em lipossomas de ramnolipídios. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 38 Supl. 1, agosto, 2017 (Resumo).

Participação em eventos científicos:

- 46° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017 (Congresso);
- VII Congresso Farmacêutico da UNESP, 2017 (Congresso);
- 1ª. Escola de Modelagem Molecular da Unesp Araraquara, 2017 (Oficina);
- 13° Congresso Estadual de Empreendedorismo NJE-CIESP, 2016 (Congresso);
- 1º Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química – UNESP, 2016 (Encontro);
- Workshop de Caracterização de Macromoléculas com Foco em Estabilidade Estrutural e Afinidade de Interações, com Uso de nanoDSF e Termoforese em Microescala (CNPEM), 2016 (Outra);
- I Congresso de Biodiversidade e Biotecnologia, 2015 (Congresso);
- I Workshop em Biotecnologia - Biocombustíveis: Tendências e desafios, 2015 (Outra);
- V Jornada de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, 2015 (Simpósio);
- II Simpósio Latino Americano de Biotecnologia, 2014 (Simpósio);

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Luciene dos Santos Carrijo e Paulo Alves Carrijo, e irmã, Cássia Dayanne dos Santos Carrijo, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha namorada, Moema Santana, pelo carinho, companheirismo e por tornar os meus dias mais felizes.

Ao meu orientador Reinaldo Marchetto pela oportunidade de realizar o presente trabalho e por todo o auxílio, disposição e lições.

Ao meu co-orientador e grande amigo Luiz Carlos Bertucci Barbosa pelos ensinamentos, conversas, amparo e dedicação na construção e execução desse projeto. Muito obrigado Luiz por ter acreditado e confiado em mim.

À professora Maria Célia Bertolini e aos seus alunos, Jonatas Campanella, Juvana Moreira e Erika Higashi, pela ótima recepção no seu laboratório e por toda a ajuda e paciência.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Milena Barbosa, Beatriz Sanches, Camila Aguiar, Thais Benites, Jesseleine Silva, Aline Buda, Leonardo Santos, Caio Proft, Carolina Zambom, Gregório Bedoya, Edson Crusca, Bianca Marques, Paulo Sanches, Norival Santos, Jaff Silva, Esteban Lorenzón, Juvana Moreira e Erika Higashi pela amizade e pelos os diversos momentos de alegria que me proporcionaram.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Instituto de Química - UNESP.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

À Vida e a todos os companheiros que me cercam, educam e protegem.

*“ Continue lutando, não pare.
Persiste mais um pouco, você é capaz.*

*Lembre-se de todas as dificuldades que já venceu, não pare agora.
Tenha coragem, você é capaz.*

*Trace objetivos, não desista dos seus planos, continue a sonhar.
Assim encontrará o sentido de tudo isso, confie em si mesmo,
você vencerá. ”*

Rodolfo dos Santos Carrijo

RESUMO

Sistemas toxina-antitoxina (TA) são tipicamente formados por dois genes que codificam uma toxina estável e uma antitoxina lábil. Esses módulos genéticos são diversos e abundantes em procariotos, sendo agrupados em seis tipos (I à VI) com base na natureza da antitoxina e no seu modo de interação com a toxina. O sistema TA GhoT/GhoS (tipo V) foi identificado em *Escherichia coli*, estando implicado no fenômeno de persistência celular (tolerância temporária à antibióticos). Embora a antitoxina desse sistema (GhoS) tenha sido bem caracterizada, os detalhes que envolvem a estrutura e os mecanismos de ação da toxina GhoT ainda não foram totalmente esclarecidos, sendo apenas demonstrado que a molécula *in vivo* ocasiona a formação de poros na membrana plasmática bacteriana, interrompendo a produção de ATP. Dessa maneira, considerando o potencial biotecnológico dos sistemas TA como alvos para o desenho de novos bactericidas, o presente trabalho caracterizou funcional e estruturalmente a proteína GhoT de *Salmonella enterica* e peptídeos derivados com capacidade de interação com membranas biológicas. Para isso, após a obtenção da sequência de aminoácidos da GhoT de *S. enterica* por BLAST e de sua predição estrutural *in silico*, a proteína e seus derivados (HN e HC) foram sintetizados pelo método químico em fase sólida, sendo purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e identificados por espectrometria de massas. Em seguida, a capacidade de estruturação das moléculas foi avaliada com o auxílio da espectroscopia de dicroísmo circular. Já as suas funções foram investigadas através de ensaios de permeabilização de vesículas lipídicas, expressão heteróloga em bactéria e atividade antimicrobiana. Coletivamente, os estudos demonstraram que os polipeptídeos estão predominantemente enovelados em α -hélice, confirmando a modelagem estrutural realizada. Além disso, constatou-se que as moléculas conservam a mesma atividade lítica verificada para a toxina GhoT de *E. coli*, destacando-se o peptídeo HN. Ademais, os polipeptídeos foram tóxicos para bactérias tanto intracelularmente (quando expressos heterologicamente) quanto extracelularmente (quando adicionados ao meio de cultura). Assim, além de apontar uma possível relação entre o produto do gene *ghoT* de *S. enterica* e a formação de células persistentes no gênero *Salmonella*, os resultados alcançados exibem o potencial uso das moléculas como modelos para o desenvolvimento de novos antibióticos.

Palavras-chave: Antibiótico. Caracterização. GhoT. *Salmonella enterica*. Sistemas toxina-antitoxina.

ABSTRACT

Toxin-antitoxin (TA) systems are typically formed by two genes encoding a stable toxin and a labile antitoxin. These genetic modules are diverse and abundant in prokaryotes and are grouped into six types (I to VI) based on the nature of the antitoxin and its mode of interaction with the toxin. The TA GhoT/GhoS system (type V) was identified in *Escherichia coli*, being implicated in the phenomenon of cell persistence (temporary tolerance to antibiotics). Although the antitoxin of this system (GhoS) has been well characterized, the details surrounding the structure and mechanisms of action of the GhoT toxin have not yet been fully elucidated, and it has only been shown that the molecule *in vivo* causes the formation of pores in the bacterial plasma membrane, disrupting the production of ATP. In this way, taking into account the biotechnological potential of TA systems as targets for the design of new bactericides, the present work characterized the GhoT protein of *Salmonella enterica* and derived peptides with interaction capacity with biological membranes. After obtaining the amino acid sequence of *S. enterica* GhoT by BLAST and its *in silico* structural prediction, the protein and analogues (HN and HC) were synthesized by the solid phase chemical method and were isolated by high performance liquid chromatography and identified by means of mass spectrometry. Then, the conformations of the molecules were evaluated with the help of circular dichroism (CD) spectroscopy. Its functions were investigated through lipid vesicle permeabilization assays, heterologous expression in bacteria and antimicrobial activity. Thus, collectively, the information revealed by the studies demonstrated that the polypeptides are predominantly anchored in α -helix, confirming the structural modeling performed. In addition, it was observed that the molecules retain the same lytic activity verified for the *E. coli* GhoT toxin, especially the HN peptide. In addition, polypeptides were toxic to bacteria both intracellularly (when expressed heterologously) and extracellularly (when added to the culture medium). Therefore, in addition to pointing out a possible relationship between the product of the *S. enterica ghoT* gene and the formation of persistent cells in the *Salmonella* genus, the results show the potential use of the molecules as models for the development of new antibiotics.

Keywords: Antibiotic. Characterization. GhoT. *Salmonella enterica*. Toxin-antitoxin systems.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mecanismo de manutenção de plasmídeos por morte pós-segregacional. Durante o processo de divisão de uma célula bacteriana, por exemplo, uma das células-filhas recebe o plasmídeo e a outra não. Devido as células-filhas herdarem parte das moléculas de toxina e antitoxina presente no citoplasma da célula-mãe, e a antitoxina ser rapidamente degradada, a célula desprovida do plasmídeo acaba sendo eliminada por não possuir o gene que expressa a antitoxina.....26
- Figura 2** - Sistemas toxina-antitoxina. Tipo I: o mRNA que codifica a toxina e o RNA antitoxina são complementares. O complexo formado é degradado por RNases celulares, inibindo a tradução da toxina. Os genes TA estão quase sempre em fitas de DNA opostas. Tipo II: a antitoxina (polipeptídeo) neutraliza a toxicidade da toxina ao se ligar a ela. Tipo III: o RNA antitoxina se liga a toxina neutralizando-a. Tipo IV: a antitoxina (polipeptídeo) neutraliza a toxina atuando como antagonista, ou seja, agindo sobre o alvo da toxina. Tipo V: a antitoxina (polipeptídeo) cliva o mRNA da toxina. Tipo VI: a antitoxina (polipeptídeo) forma um complexo com a toxina, o qual é degradado pela protease ClpXP. 27
- Figura 3** - Possível modelo para a relação existente entre os pares TA MqsR/MqsA e GhoT/GhoS. A antitoxina GhoS (azul) cliva especificamente o mRNA que codifica a toxina GhoT (verde). A toxina MqsR (amarelo) degrada a grande maioria dos mRNA celulares, incluindo o mRNA da GhoS, quando a sua antitoxina cognata MqsA (cinza) é destruída, como em situações de estresse. Em condições em que o mRNA da GhoS é clivado, tanto pela MqsR ou outra RNase, a toxina GhoT é expressada. A sua superexpressão está associada a persistência e danos a membrana plasmática bacteriana.....31
- Figura 4** - Estrutura primária de aminoácidos da toxina GhoT de *Escherichia coli*...34
- Figura 5** - Esquema das principais etapas empregadas durante a síntese de peptídeos em fase sólida. 36
- Figura 6** - (a) Representação esquemática de uma ligação peptídica, evidenciando os ângulos Φ e ψ . (b) Espectros de dicroísmo circular característicos das estruturas secundárias em α -hélice, folha- β e random-coil.....39
- Figura 7** - Representação esquemática de diferentes lipossomas com relação ao (a) tamanho e (b) número de lamelas. Vesícula unilamelar pequena (SUV); Vesícula unilamelar grande (LUV); Vesícula unilamelar gigante (GUV); Vesícula multilamelar (MLV). Cada linha representa uma bicamada lipídica ou lamela. 40
- Figura 8** - Estruturas dos lipídeos utilizados na formação dos lipossomas. (a) POPE, (b) POPG e (c) cardiolipina. 41
- Figura 9** - Mapa do vetor de expressão pET24a utilizado para a produção heteróloga da proteína GhoT e dos peptídeos HN e HC em *Escherichia coli*.....43
- Figura 10** - Estrutura primária da toxina GhoT de *Salmonella enterica*. 46

Figura 11 - Alinhamento global entre as sequências da toxina GhoT de (I) *Escherichia coli* e (II) *Salmonella enterica*, por meio da ferramenta BLAST. Score: consiste na nota atribuída pelo algoritmo, baseada no número de pareamentos perfeitos e imperfeitos; E-value: valor estatístico que indica se o alinhamento é real ou foi obtido simplesmente pelo acaso no banco de dados; Identidade: número de resíduos similares identificados no alinhamento e expresso, em porcentagem, a partir da comparação com o comprimento deste alinhamento. Positivos: soma do número de aminoácidos idênticos e aqueles que são diferentes na comparação, mas que apresentam Score positivo na tabela. Aminoácidos não idênticos, mas com propriedades físico-químicas preservadas são considerados como positivos; Gap: espaço introduzido em um alinhamento para compensar regiões de inserção ou deleção em uma das duas sequências. 47

Figura 12 - Estruturas secundárias da proteína GhoT de *Salmonella enterica* previstas pelo servidor PSIPRED. 48

Figura 13 - Possíveis regiões de interação com membrana (retângulos verdes - resíduos de aminoácidos do 7 ao 26; 36 ao 55) da proteína GhoT de *Salmonella enterica* previstas pelo servidor PSIPRED. 48

Figura 14 - Predição da estrutura molecular da GhoT de *Salmonella enterica* utilizando o servidor Phyre². 49

Figura 15 - Estrutura primária da proteína (I) GhoT (57 resíduos de aminoácidos) de *Salmonella enterica*, e dos peptídeos (II) HN (extremidade N-terminal) e (III) HC (extremidade C-terminal) que correspondem às possíveis regiões de imersão da toxina com a membrana plasmática (contêm 29 resíduos de aminoácidos cada). ...49

Figura 16 - Perfis cromatográficos da proteína GhoT (a) antes e (b) após a purificação, utilizando uma coluna analítica Shimadzu C18 (256 x 4,6 mm), com gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: acetonitrila, 0,036% TFA) em 42 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. 50

Figura 17 - Perfis cromatográficos do peptídeo HN (a) antes e (b) após a purificação, utilizando uma coluna analítica Shimadzu C18 (256 x 4,6 mm), com gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: acetonitrila, 0,036% TFA) em 42 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. 51

Figura 18 - Perfis cromatográficos do peptídeo HC (a) antes e (b) após a purificação, utilizando uma coluna analítica Shimadzu C18 (256 x 4,6 mm), com gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: acetonitrila, 0,036% TFA) em 42 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. 51

Figura 19 - Espectro de massas da proteína GhoT pura. Massa molecular: 6677,6 g.mol⁻¹. 52

Figura 20 - Espectro de massas do peptídeo HN puro. Massa molecular: 3496,26 g.mol⁻¹. 52

Figura 21 - Espectro de massas do peptídeo HC puro. Massa molecular: 3368,06 g.mol⁻¹. 53

Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular da proteína (a) GhoT e peptídeos (b) HN e (c) HC na presença de tampão fosfato-salino (10 mmol.L⁻¹) em pH 7,2 (PBS); tampão PBS + Dodecil sulfato de sódio (SDS) (10 mmol.L⁻¹); e tampão PBS + Trifluoroetanol (TFE) (60%). Concentração dos polipeptídeos: 50 µmol.L⁻¹. 55

Figura 23 - Permeabilização de LUVs, formadas por POPE (75%), POPG (22%) e cardiolipina (3%), contendo carboxifluoresceína no interior, em diferentes concentrações da proteína (a) GhoT e peptídeos (b) HN e (c) HC. No tempo de 1 minuto foi acrescido a proteína/peptídeo na concentração desejada ao sistema constituído pelo tampão PBS 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2) e vesículas. Aos 9 minutos foi adicionado o Triton x-100. 56

Figura 24 - Representação dos modelos mais aceites para a permeabilização de bicamadas lipídicas por peptídeos: (a) modelo forma de barril (formação de poros). As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos polipeptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente; (b) modelo poro toroidal. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos polipeptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, nessa ordem. Em amarelo destaca-se a cabeça polar dos lipídeos participante do poro; (c) modelo de solubilização-carpete como mecanismo de permeabilização da membrana. As regiões hidrofóbicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente. 57

Figura 25 - Curvas de crescimento para a bactéria competente *Escherichia coli* cepa Rosetta (preto) transformada com os vetores pET24a-GhoT (vermelho), pET24a-HC (verde), pET24a-HN (azul) e pET24a sem inserto (cinza). No tempo 3 horas as culturas foram induzidas com IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo). 59

Figura 26 - Atividade antibacteriana da proteína GhoT (vermelho) de *Salmonella enterica* e peptídeos HC (verde) e HN (azul) frente a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* O157:H7. Controle positivo: ciprofloxacina (cinza) (80 µmol.L⁻¹). 61

Figura 27 - Atividade antibacteriana da proteína GhoT (vermelho) de *Salmonella enterica* e peptídeos HC (verde) e HN (azul) frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Controle positivo: ciprofloxacina (cinza) (80 µmol.L⁻¹). 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégia empregada em cada ciclo de acoplamento durante a síntese de peptídeos em fase sólida. 37

Tabela 2 - Razão massa molecular/carga (g.mol^{-1}) teórica calculada para a proteína GhoT de *Salmonella enterica* e peptídeos HN e HC. 53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1. Aminoácidos

Ala (A) - alanina
Arg (R) - arginina
Asp (D) - ácido aspártico
Gln (Q) – glutamina
Gly (G) - glicina
His (H) - histidina
Ile (I) - isoleucina
Leu (L) - leucina
Lys (K) - lisina
Met (M) - metionina
Phe (F) - fenilalanina
Pro (P) - prolina
Ser (S) - serina
Thr (T) - treonina
Trp (W) - triptofano
Tyr (Y) - tirosina
Val (V) - Valina

2. Outras terminologias

BLAST - ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
CF – carboxifluoresceína
CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
DC - dicroísmo circular
DCM - diclorometano
DIC - N,N'- diisopropilcarbodiimida
DMSO - dimetilsulfóxido
DMF - dimetilformamida
DNA - ácido desoxirribonucleico
Fmoc - 9-fluorenilmetiloxycarbonila
Fmoc-AA - 9-fluorenilmetiloxycarbonila-aminoácido
ghoST - GhoS/GhoT
GUV - vesícula unilamelar gigante
hip - *high persister protein A*
HOBt - N-hidroxibenzotriazol
LUV - vesícula unilamelar grande
MLV - vesícula multilamelar
mqsAR - MqsA/MqsR
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
PBS – tampão fosfato-salino

POPE - 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
POPG - 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol)
RNA - ácido ribonucleico
SDS – dodecil sulfato de sódio
SPFS – síntese de peptídeos em fase sólida
SUV - vesícula unilamelar pequena
TA - toxina-antitoxina
tBu - terc-butílicos
TFA - ácido trifluoroacético
TFE - trifluoroetanol

3. Símbolos

α - alfa
 β - beta
 Φ - phi
 Ψ - psi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Classificação dos sistemas toxina-antitoxina	27
1.2. Persistência celular	28
1.3. Biofilmes e persistência celular	29
1.4. Sistemas toxina-antitoxina e persistência celular	29
1.5. Gênero <i>Salmonella</i>	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Busca da sequência proteica homóloga, alinhamento de sequências e predição estrutural	34
3.2. Síntese de peptídeos em fase sólida	34
3.3. Purificação e caracterização	37
3.4. Espectroscopia de dicroísmo circular	38
3.5. Permeabilização de vesículas	40
3.6. Síntese gênica e subclonagem no vetor pET24a	42
3.6.1. Transformação bacteriana	44
3.6.2. Expressão heteróloga	44
3.7. Atividade antibacteriana	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Busca da sequência proteica homóloga, alinhamento de sequências e predição estrutural	46
4.2. Síntese de peptídeos em fase sólida	49
4.3. Purificação e caracterização	50
4.4. Espectroscopia de dicroísmo circular	54
4.5. Permeabilização de vesículas	56
4.6. Expressão heteróloga	58
4.7. Atividade antibacteriana	60
5. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

Amplamente difundidos em organismos procarióticos, os sistemas toxina-antitoxina (TA) são importantes módulos genéticos formados, geralmente, por dois elementos, sendo eles uma toxina e uma antitoxina cognata. Em condições favoráveis ao crescimento celular a toxina é normalmente neutralizada pela antitoxina. Contudo, sob condições de estresse (tal como na presença de substâncias nocivas e em situações de escassez de nutrientes) as antitoxinas são rapidamente degradadas por proteases e RNases, tornando as toxinas livres para agir sobre os seus alvos com consequente interferência em processos celulares fundamentais, como a replicação do DNA, tradução de proteínas e produção de ATP (BARBOSA et al., 2014; MASUDA; INOUE, 2017).

Os sistemas TA foram descobertos inicialmente em plasmídeos como um mecanismo de manutenção desses fragmentos de DNA extracromossomais, processo denominado de morte pós-segregacional (Figura 1). Posteriormente, também foram encontrados nos cromossomos de bactérias e arqueobactérias participando de outros eventos celulares importantes, tais como a formação de biofilmes, proteção contra bacteriófagos, reparação do DNA cromossomal e resposta a condições adversas (BUSTAMANTE; IREDELL, 2017; PAGE; PETI, 2016;).

Assim, os módulos TA podem ser compreendidos basicamente como entidades genéticas que regulam o crescimento celular em procariotos. Em bactérias essa regulação tem sido especialmente observada na presença de antimicrobianos, estando diretamente associada à persistência bacteriana (fenômeno em que bactérias exibem tolerância temporária à antibióticos) (GERMAIN et al., 2015; HALL; GOLLAN; HELAINE, 2017).

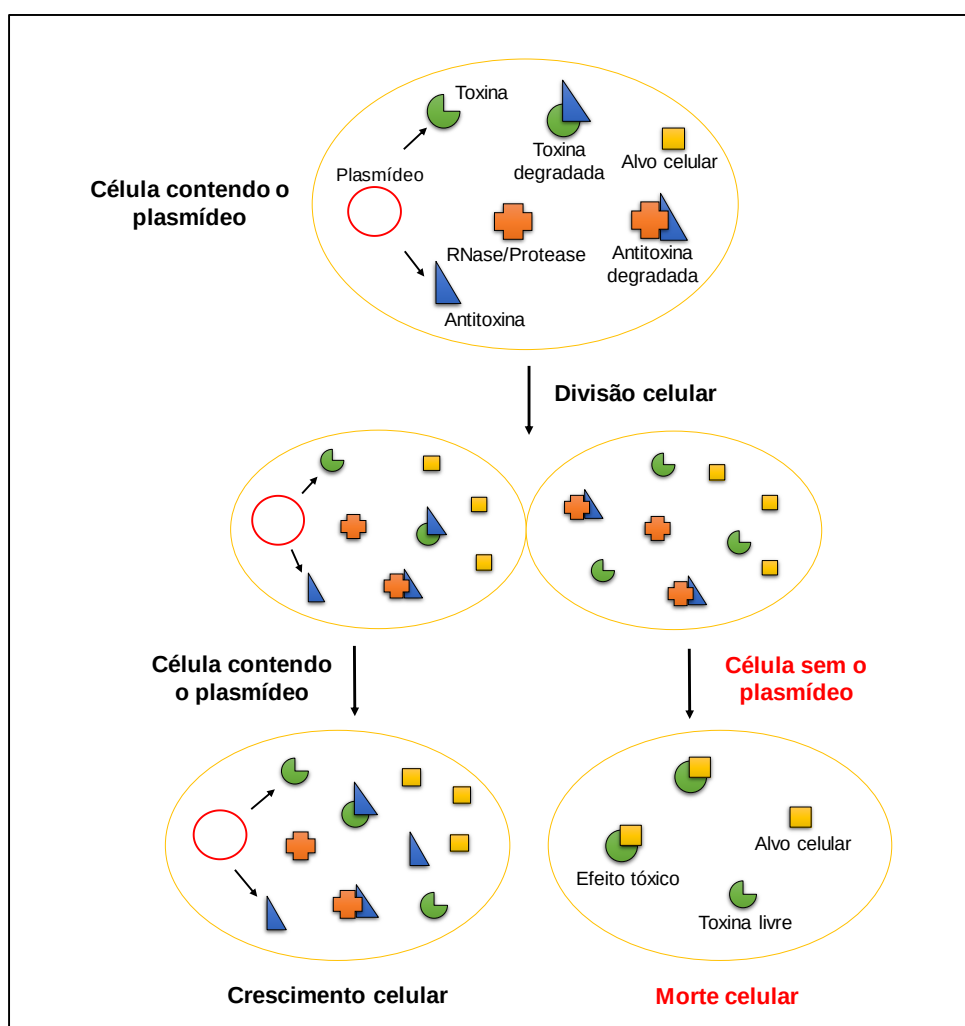
Atualmente, as empresas farmacêuticas têm dedicado grandes esforços para obter novas versões de velhas classes de antibióticos, abandonando pesquisas que têm como foco moléculas inexploradas. Como resultado, há uma diminuição da capacidade total de geração de novos bactericidas (FERNANDES; MARTENS, 2017; PAYNE, 2008).

Portanto, o desenvolvimento de medicamentos a partir de moléculas que apresentem ação contra diferentes organismos e que possam atuar em conjunto com drogas já existentes, criando um efeito aditivo ou sinérgico, é um campo biotecnológico bastante atrativo e promissor, onde compreender as suas estruturas e

os seus mecanismos de ação é certamente a “chave” para a síntese de fármacos mais eficazes (MAISONNEUVE; CAMARGO; GERDES, 2013; NAGHMOUCHI, 2012).

Nessa perspectiva, os sistemas TA se apresentam como modelos interessantes para estudo em decorrência da sua extensa distribuição nos genomas procarióticos e funções exercidas, as quais estão diretamente relacionadas à sobrevivência e patogenicidade bacteriana (BANIN; HUGHES; KUIPERS, 2017; WANG; WOOD, 2011).

Figura 1 - Mecanismo de manutenção de plasmídeos por morte pós-segregacional. Durante o processo de divisão de uma célula bacteriana, por exemplo, uma das células-filhas recebe o plasmídeo e a outra não. Devido as células-filhas herdarem parte das moléculas de toxina e antitoxina presentes no citoplasma da célula-mãe, e a antitoxina ser rapidamente degradada, a célula desprovida do plasmídeo acaba sendo eliminada por não possuir o gene que expressa a antitoxina.

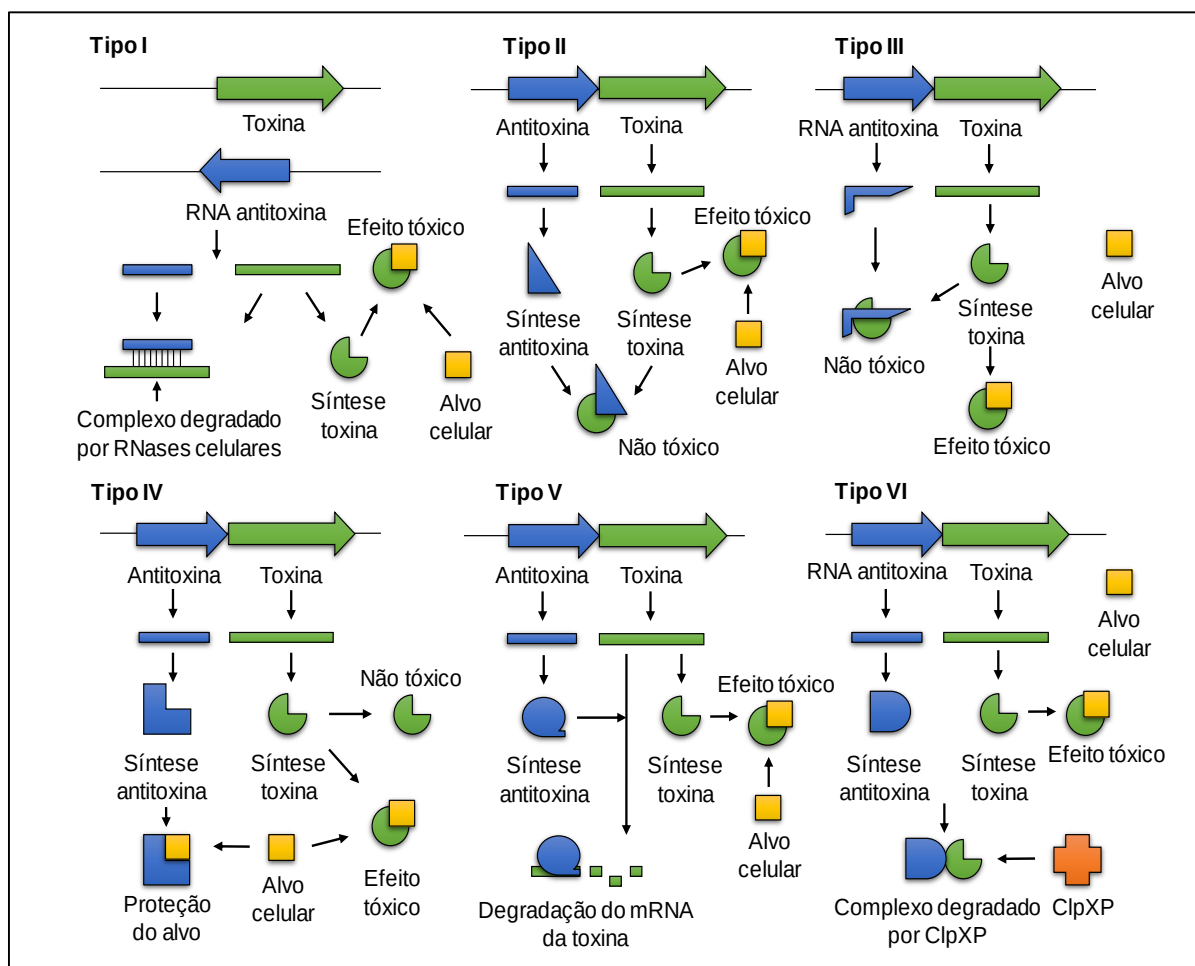


Fonte: elaborado pelo autor.

1.1. Classificação dos sistemas toxina-antitoxina

De acordo com a natureza da antitoxina (RNA ou polipeptídeo) e o seu modo de interação com a toxina (sempre é um polipeptídeo), os sistemas TA são atualmente agrupados em seis tipos: I à VI (Figura 2) (PAGE; PETI, 2016).

Figura 2 - Sistemas toxina-antitoxina. Tipo I: o mRNA que codifica a toxina e o RNA antitoxina são complementares. O complexo formado é degradado por RNases celulares, inibindo a tradução da toxina. Os genes TA estão quase sempre em fitas de DNA opostas. Tipo II: a antitoxina (polipeptídeo) neutraliza a toxicidade da toxina ao se ligar a ela. Tipo III: o RNA antitoxina se liga a toxina neutralizando-a. Tipo IV: a antitoxina (polipeptídeo) neutraliza a toxina atuando como antagonista, ou seja, agindo sobre o alvo da toxina. Tipo V: a antitoxina (polipeptídeo) cliva o mRNA da toxina. Tipo VI: a antitoxina (polipeptídeo) forma um complexo com a toxina, o qual é degradado pela protease ClpXP.



Fonte: elaborado pelo autor.

No sistema tipo I, a antitoxina é um RNA *antisense* que suprime o efeito da toxina através da ligação ao seu mRNA, em que a formação do duplex inibe o seu

processo de tradução. Já no sistema tipo III, a antitoxina também é um RNA, mas não um RNA *antisense*. A toxina é neutralizada por meio da formação do complexo TA, ou seja, por meio da interação direta entre as moléculas (BLOWER et al., 2012; FOZO et al., 2010).

Nos sistemas tipo II, IV, V e VI as antitoxinas são polipeptídeos, porém, diferem nos seus mecanismos de ação. Assim, enquanto que no tipo II a antitoxina se liga diretamente à toxina para neutralizar a sua toxicidade, no sistema tipo IV ela atua como antagonista anulando a toxina ao interagir com o seu alvo celular e no tipo V funciona como RNase clivando o mRNA que codifica a toxina impossibilitando a sua expressão. Por último, no tipo VI, a antitoxina se liga a toxina induzindo a degradação do complexo pela protease ClpXP (AAKRE et al., 2013; GERDES; CHRISTENSEN; LØBNER-OLESEN, 2005; LEPLAE et al., 2011; MASUDA et al., 2012; WANG et al., 2012).

1.2. Persistência celular

A persistência bacteriana é um fenômeno no qual subpopulações de células não mutantes sobrevivem ao tratamento de antibióticos. Em razão de se tratar de um fenótipo temporário é importante enfatizar que as células persistentes não são resistentes a esses compostos, mas apenas tolerantes. Isso significa que elas não crescem na presença deles, mas também não morrem, sendo essa particularidade o elemento-chave desse grupo celular (HELAINÉ; KUGELBERG, 2014; KEREN et al., 2004; KĘDZIERSKA; HAYES, 2016).

A persistência foi primeiramente descrita em 1944 pelo pesquisador irlandês Joseph Warwick Bigger (1891-1951) ao tentar esterilizar culturas patogênicas de *Staphylococcus aureus* com penicilina. A partir de seus ensaios, Bigger constatou que mesmo após o tratamento com altas concentrações do bactericida um pequeno número de células ainda "persistia", sendo posteriormente capazes de formar colônias (BIGGER, 1944).

Alguns anos após a descoberta de Bigger, os primeiros estudos clínicos *in vivo* sobre a persistência confirmaram que a mesma era de fato um problema importante e singular no tratamento de infecções, onde as suas implicações são óbvias: ela pode diminuir a eficiência da ação dos antibióticos e as bactérias sobreviventes podem

prolongar os quadros infecciosos (ALLISON; BRYNILDSEN; COLLINS, 2011; GERMAIN et al., 2015).

Na maioria dos casos, o prolongamento dos quadros de infecção está ligado à patógenos que se agregam na forma de biofilmes, ocorrência que pode indicar a origem do problema. Os biofilmes não restringem a penetração de antibióticos e, apesar de a maioria das células que os constituem ser susceptível a ação deles, as infecções por biofilmes tipicamente exibem sintomas recorrentes devido à sobrevivência de uma pequena fração celular (LEWIS, 2007).

1.3. Biofilmes e persistência celular

No meio ambiente, os microrganismos dificilmente se encontram na forma de colônias isoladas, estabelecendo-se geralmente em comunidades denominadas de biofilmes. Os organismos que ali crescem muitas vezes exibem uma variedade de diferenças fenotípicas das mesmas estirpes em crescimento planctônico, que incluem alterações na motilidade, aumento da produção de polissacarídeos extracelulares e tolerância a antimicrobianos, que possibilitam o desenvolvimento celular em ambientes hostis (GBEJUADE; LOVERING; WEBB, 2015; TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Como consequência, os biofilmes têm sido associados a vários tipos de doenças, como cáries dentárias, endocardite, cistite e fibrose cística, atuando particularmente como barreiras para os componentes maiores do sistema imune, como os anticorpos. Desse modo, os biofilmes aparentemente servem como um habitat de proteção para as células persistentes, o que lhes permitem “fugir” da resposta imune (LEWIS, 2007; ROBERTS et al., 2015).

1.4. Sistemas toxina-antitoxina e persistência celular

A maior parte das pesquisas sobre a formação de células persistentes foi realizada utilizando a bactéria *Escherichia coli* como modelo, o que possibilitou a identificação de um grande número de genes possivelmente envolvidos com o fenômeno, destacando-se os seguintes pares TA: ChpB/ChpS, GhoT/GhoS, HipA/HipB, MazF/MazE, MqsR/MqsA e RelE/RelB. Contudo, devido às dificuldades

em se estudar uma pequena porção de células que expressam um fenótipo temporário, os mecanismos que permeiam o evento ainda não são claros (HALL; GOLLAN; HELAINE, 2017; LEWIS, 2007; PAGE; PETI, 2016).

Na década de 1980, o pesquisador norte-americano Harris Moyed (1925-1998) deu início a vários estudos sobre a base molecular da persistência em *E. coli*, sendo o gene *hipA* (*high persister protein A*) o primeiro a ser relacionado a ela. Moyed, ao isolar estirpes que exibiam uma maior frequência do fenômeno, identificou ainda alterações importantes nesse gene que proporcionavam uma maior capacidade de sobrevivência às células mutadas (denominadas de *hipA7*) à exposição ao antibacteriano ácido nalidíxico (HENDERSON; HILL, 2003; KORCH; SCHUMACHER et al., 2015; MOYED; BERTRAND, 1983).

Posteriormente, foi demonstrado que o gene *hipA* (codifica a toxina hipA) juntamente com o gene *hipB* (codifica a antitoxina hipB) constituem um módulo TA. Acredita-se que a expressão da toxina hipA leva à formação de bactérias persistentes através do bloqueio da síntese de proteínas por meio da fosforilação do fator de alongação Tu, em que a inibição da tradução produz um “desligamento” posterior de outras funções importantes, tais como a replicação do DNA e a síntese da parede celular que são os principais alvos de muitos antibióticos (MAISONNEUVE; CAMARGO; GERDES, 2013).

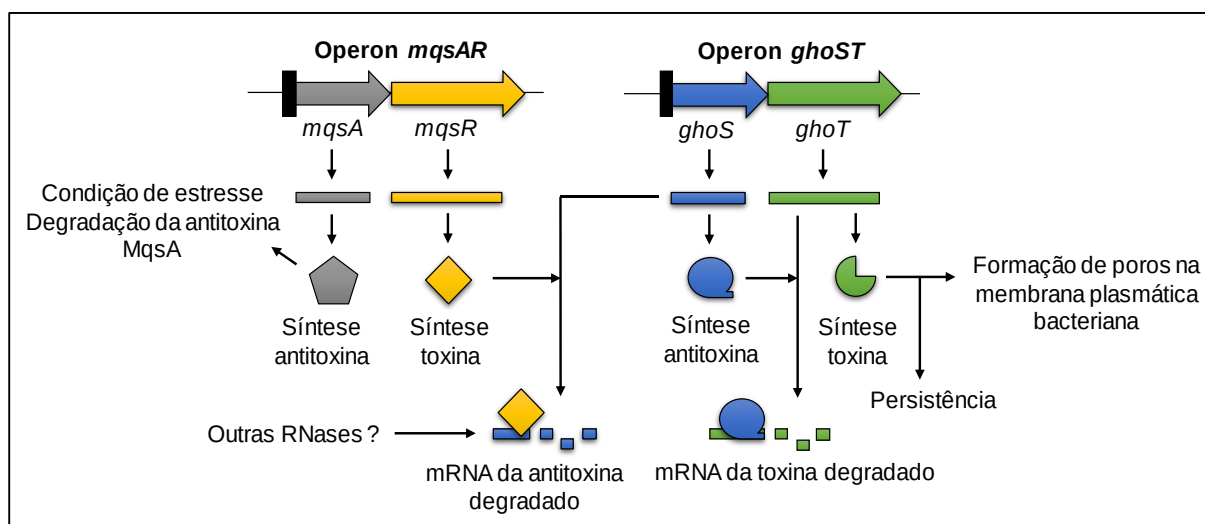
No entanto, apesar de já ser conhecida a relação entre o módulo HipA/HipB e a formação de persistentes, a prova irrefutável de que um sistema TA estava conectado com o fenótipo foi encontrada no operon *mqsAR* (que codifica o par TA MqsR/MqsA) em *E. coli*. Foi observado que a supressão do gene *mqsR*, que codifica a toxina MqsR, diminuiu consideravelmente a presença de bactérias tolerantes, ao passo que a sua superexpressão elevou a quantidade de células com essa característica (WANG; WOOD, 2011).

Com base nos estudos sobre o par proteico GhoT/GhoS (*ghoST*), Wang et al. (2012), além de apresentarem um novo tipo de sistema TA (tipo V), propõem ainda uma conexão interessante entre os módulos *mqsAR* e *ghoST* (Figura 3). A ligação entre os sistemas se baseia na vulnerabilidade do transcrito que codifica a antitoxina GhoS à atividade da toxina MqsR (que atua como RNase) (VAN MELDEREN, 2012).

Logo, sob condições nas quais o gene *mqsR* é expresso, por exemplo, na presença de bactericidas, o mRNA da GhoS é degradado e o gene *ghoT* é parte de um grande grupo de genes que são expressos e que contribuem para a persistência.

Com efeito, a exclusão do gene *ghoT* em *E. coli* diminuiu a ocorrência do fenômeno mediado pela MqsR e suprimiu a capacidade de formação de biofilme da bactéria de maneira significativa, enquanto que a sua superexpressão conduziu ao aparecimento do fenótipo de persistência e aumento da formação de biofilme em mais de 6 vezes (WANG et al., 2012).

Figura 3 - Possível modelo para a relação existente entre os pares TA MqsR/MqsA e GhoT/GhoS. A antitoxina GhoS (azul) cliva especificamente o mRNA que codifica a toxina GhoT (verde). A toxina MqsR (amarelo) degrada a grande maioria dos mRNA celulares, incluindo o mRNA da GhoS, quando a sua antitoxina cognata MqsA (cinza) é destruída, como em situações de estresse. Em condições em que o mRNA da GhoS é clivado, tanto pela MqsR ou outra RNase, a toxina GhoT é expressada. A sua superexpressão está associada a persistência e danos a membrana plasmática bacteriana.



Fonte: elaborado pelo autor.

No entanto, embora a antitoxina GhoS tenha sido bem caracterizada, os detalhes que envolvem a estrutura e os mecanismos de ação da GhoT ainda não foram totalmente esclarecidos. Até o momento, por exemplo, é demonstrado somente que a ação da toxina *in vivo* ocasiona a formação de poros na membrana plasmática bacteriana, interrompendo a produção de ATP (CHENG et al., 2014; VAN MELDEREN, 2012; WANG et al., 2012).

1.5. Gênero *Salmonella*

Os integrantes que compõem o gênero *Salmonella* consistem, de modo geral, em bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos.

São habitantes comuns do trato intestinal de vários animais, sendo divididos em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP, 2010).

A espécie *S. enterica* é a principal apresentando mais de 2400 sorovares. A maior parte dos seus membros é considerada potencialmente capaz de causar doenças infecciosas aos seus hospedeiros, podendo ainda, com respeito a patogenicidade, ser classificada em tifoide e não tifoide (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Sem dúvida, a febre tifoide (causada pela *S. enterica* sorotipo Typhi) é a patologia mais crítica ocasionada por bactérias desse gênero. Acometendo exclusivamente humanos, essa mazela é responsável por aproximadamente 200 mil mortes todos os anos no mundo, sobretudo em locais que possuem um controle sanitário deficitário, visto que a transmissão do patógeno ocorre a partir de fezes contaminadas (GALÁN, 2016).

Atualmente, os fármacos mais eficientes no tratamento da febre tifoide são as quinolonas e cefalosporinas de terceira geração. No entanto, casos de tolerância a essas drogas são recorrentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Nesse contexto, trabalhos como os de Claudi et al. (2014), De la Cruz et al. (2013) e Slattery et al. (2013) reforçam o fato de que os módulos TA contribuem para a formação de células persistentes em biovares de *S. enterica*.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo geral caracterizar funcional e estruturalmente a toxina GhoT de *Salmonella enterica* e peptídeos derivados com potencial capacidade de interação com membranas biológicas.

2.1. Objetivos específicos

De maneira específica, foram objetivos do estudo:

1. Obter a sequência homóloga da GhoT em *S. enterica*, a partir da sequência de aminoácidos da toxina de *Escherichia coli*.
2. Realizar a predição da estrutura molecular da proteína GhoT de *S. enterica* e das possíveis regiões de imersão da molécula na membrana plasmática bacteriana;
3. Sintetizar quimicamente a GhoT de *S. enterica* e peptídeos derivados que correspondam às possíveis regiões de interação da proteína com a membrana citoplasmática de bactérias;
4. Caracterizar estruturalmente as moléculas sintetizadas por dicroísmo circular;
5. Realizar experimentos de interação com miméticos de membrana;
6. Avaliar a influência dos polipeptídeos no crescimento *in vitro* de bactérias;
7. Expressar heterologamente a proteína GhoT de *S. enterica* e derivados em bactéria, com o propósito de estudar as suas toxidades *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Busca da sequência proteica homóloga, alinhamento de sequências e predição estrutural

A sequência de aminoácidos homóloga da toxina GhoT em *S. enterica* foi obtida pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando a sequência de aminoácidos da GhoT da bactéria *E. coli* (Figura 4) como consulta. O alinhamento das sequências foi realizado com a mesma ferramenta.

Figura 4 - Estrutura primária de aminoácidos da toxina GhoT de *Escherichia coli*.

1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
MALFSKILIFYVIGVNISFVIIWFISHEKTHIRLLSAFLVGITWPMSLPVALLFSLF											

Fonte: adaptado de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

As estruturas secundárias e possíveis regiões de interação com a membrana da GhoT de *S. enterica* foram preditas utilizando o servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Adicionalmente, a sua estrutura molecular foi prevista utilizando o servidor Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>).

3.2. Síntese de peptídeos em fase sólida

Peptídeos são compostos formados pela união de dois ou mais resíduos de aminoácidos. Essa união ocorre por meio de uma reação de condensação envolvendo o grupo α -carboxílico de um aminoácido e o grupo α -amínico de outro, produzindo a denominada ligação peptídica (NELSON; COX, 2011).

A produção de peptídeos pode ser realizada por três metodologias diferentes: síntese química, enzimática e via DNA recombinante. A síntese química diferencia-se por utilizar reagentes químicos para ativar o grupo carboxílico de um N- α -acil-aminoácido ou N- α -acil-fragmento peptídico. O grupo carboxílico ativado sofre então o ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido resultando na formação da ligação peptídica entre eles (MACHADO et al., 2004).

Inicialmente, a síntese química era realizada inteiramente em solução (método clássico). No entanto, o processo apresentava limitações, como o baixo rendimento alcançado do polipeptídeo final devido às dificuldades encontradas em isolar e purificar o produto desejado de cada uma das várias reações existentes (KATES; ALBERICIO, 2000; VOET; VOET, 2013).

Com o propósito de contornar esses entraves, na década de 1960, Robert Bruce Merrifield (1921-2006) apresentou à comunidade científica uma nova metodologia que introduzia o emprego de polímeros insolúveis como suporte para a síntese. Nesse método, denominado de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), a cadeia polipeptídica em construção está ligada covalentemente, normalmente pela extremidade C-terminal, ao suporte polimérico (MERRIFIELD, 1963).

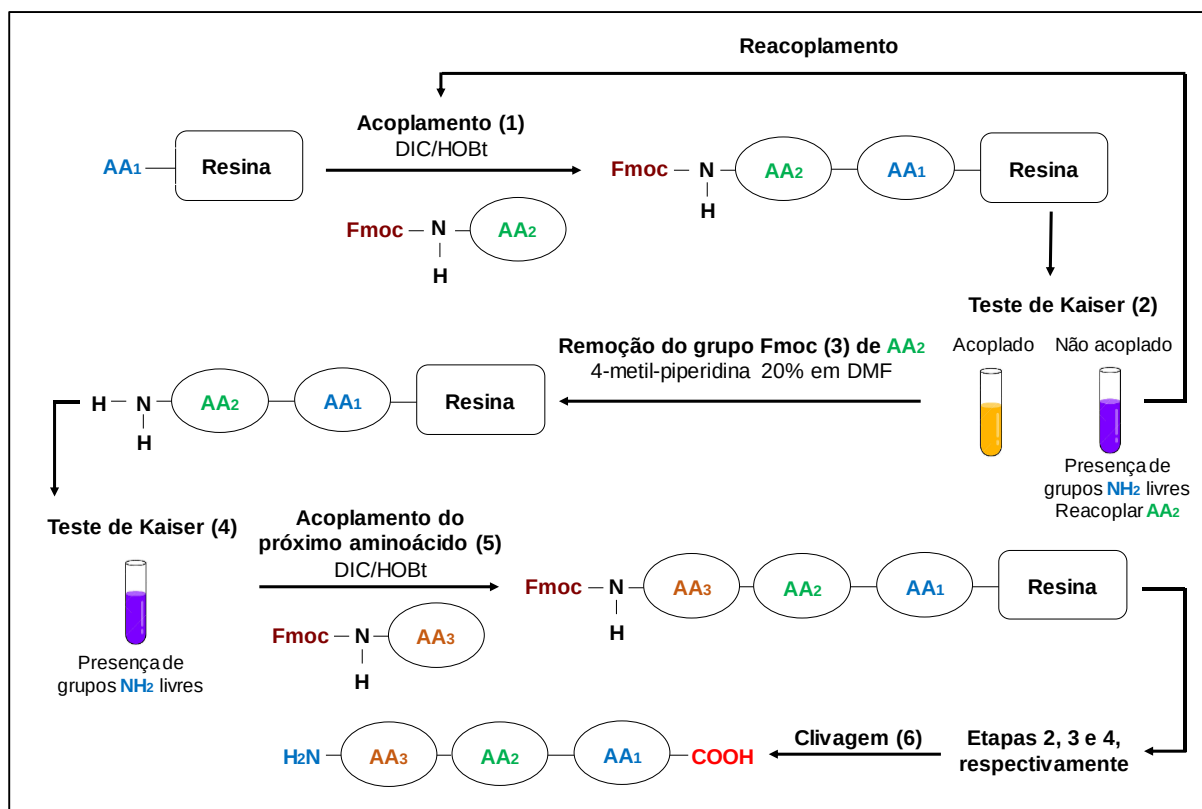
Assim, pelo fato de o componente que contém a extremidade C-terminal ser insolúvel nos solventes utilizados durante a síntese, o excesso de reagentes empregados e a maioria dos produtos secundários produzidos no decorrer do processo podem ser eliminados de forma simples por meio de uma filtração. Como consequência, as perdas do produto pretendido são minimizadas, elevando o seu rendimento final (KATES; ALBERICIO, 2000; MERRIFIELD, 1963; NELSON; COX, 2011).

Durante a síntese, com o objetivo de evitar reações indesejadas, cada aminoácido que está sendo incorporado à cadeia deve ter o seu grupo α -amino protegido. Após a inserção do aminoácido, seu grupo amino (agora o novo N-terminal do peptídeo) deve ser desprotegido de maneira que a próxima ligação peptídica possa ser realizada. Ademais, as cadeias laterais reativas, quando presentes, também devem ser protegidas impedindo a ocorrência de reações paralelas, sendo desprotegidas ao final da síntese (MACHADO et al., 2004; VOET; VOET, 2013).

Nesse trabalho, a proteína GhoT e peptídeos derivados, que correspondem às possíveis regiões de imersão da toxina com a membrana plasmática bacteriana, foram sintetizados manualmente pelo método químico em fase sólida. Foram empregados o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butilicos (tBu) para a proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais. Os agentes de acoplamento, utilizados para a ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido (Fmoc-AA), foram o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) e N-hidroxibenzotriazol (HOBt).

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, esquematizado na Figura 5, foi utilizado um excesso molar de três vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina, tanto para o Fmoc-AA quanto para os agentes de condensação, inicialmente em uma mistura de Dimetilformamida (DMF) e Diclorometano (DCM) (1:1), por um período de duas horas. A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc) após a inserção de cada aminoácido foi realizada empregando-se uma solução de 4-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF por um período de 20 minutos (Etapa 3 - Figura 5).

Figura 5 - Esquema das principais etapas empregadas durante a síntese de peptídeos em fase sólida.



Fonte: elaborado pelo autor.

A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de Kaiser (Etapas 2 e 4 - Figura 5) e quando positivo (acoplamento incompleto) o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes (KAISER et al., 1970). Já a acetilação, quando necessária, foi realizada com anidrido acético e diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF por 30 minutos.

A estratégia utilizada em cada ciclo de acoplamento durante a SPFS está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Estratégia empregada em cada ciclo de acoplamento durante a síntese de peptídeos em fase sólida.

Reagentes/Solventes	Etapa	Tempo (min)	Ciclos
DMF	Lavagem	1	3
4-metil-piperidina 20% em DMF	Lavagem	1	1
4-metil-piperidina 20% em DMF	Desproteção	20	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6
Fmoc-AA-OH (3 eq.) + DIC/HOBt (3 eq.) em DCM/DMF (1:1)	Acoplamento	120	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6

Fonte: elaborado pelo autor.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais (Etapa 6 - Figura 5) foi efetuada pelo tratamento das peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo ácido trifluoroacético (TFA) (94,5%), água deionizada (2,5%), Etanoditiol (2,5%) e Triisopropilsilano (0,5%) a 25°C por três horas.

Após a clivagem, os peptídeos, denominados brutos, foram precipitados com éter etílico gelado, lavados e centrifugados seis vezes com o mesmo solvente com o objetivo de remover os reagentes de clivagem presentes. O precipitado obtido foi extraído da resina com uma solução 75% de acetonitrila em água. O sobrenadante contendo o material desejado foi liofilizado.

3.3. Purificação e caracterização

A purificação das moléculas sintetizadas foi realizada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), no modo semi-preparativo em um cromatógrafo *Shimadzu* LC-10A/C-47A empregando as colunas de fase reversa *Kromasil* C8 (250 x 4,6 mm) e *Nucleosil* C18 (250 x 10 mm) com fluxo e gradiente linear de componente orgânico (acetonitrila/ TFA 0,036%) variável de

acordo com a sequência peptídica. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm.

A caracterização e a determinação do teor de pureza das frações obtidas foram realizadas por CLAE-FR em modo analítico através de um cromatógrafo UFLC *Shimadzu* utilizando uma coluna *Shimadzu* C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å) e como fase móvel as soluções A (H₂O/TFA 0,045%) e B (ACN/TFA 0,036%). Para as análises foi aplicado um gradiente de 5 a 95% da solução B em 42 minutos sob fluxo de 1,0 mL/min, sendo a eluição monitorada com o auxílio de um detector de UV nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm.

A confirmação da identidade dos produtos obtidos foi efetuada empregando um espectrômetro de massas *Bruker Amazon SL* acoplado a um cromatógrafo de fase líquida *Shimadzu* no modo de ionização positivo. O espectro de massas apresenta a razão massa molecular/carga (MM/z), em que as massas moleculares obtidas experimentalmente podem ser calculadas empregando a equação abaixo:

$$MM_{\text{polipept}} = (MM \cdot z) - (z \cdot MM_{H^+})$$

sendo **MM_{polipept}** a massa molecular do polipeptídeo em análise; **MM** é a razão massa molecular/carga obtida pela espectrometria de massas; **z** o número de cargas que contém o polipeptídeo ($z = 1, 2, 3, \dots$) e **MM_{H⁺}** a massa molecular do hidrogênio protonado, de valor 1,008 g.mol⁻¹.

3.4. Espectroscopia de dicroísmo circular

Devido à assimetria estrutural, compostos quirais, como peptídeos e proteínas, absorvem a luz circularmente polarizada no sentido horário diferentemente da luz circularmente polarizada no sentido anti-horário, sendo essa diferença de absorção medida pela espectroscopia de dicroísmo circular (DC) (CORRECIRC; RAMOS, 2009).

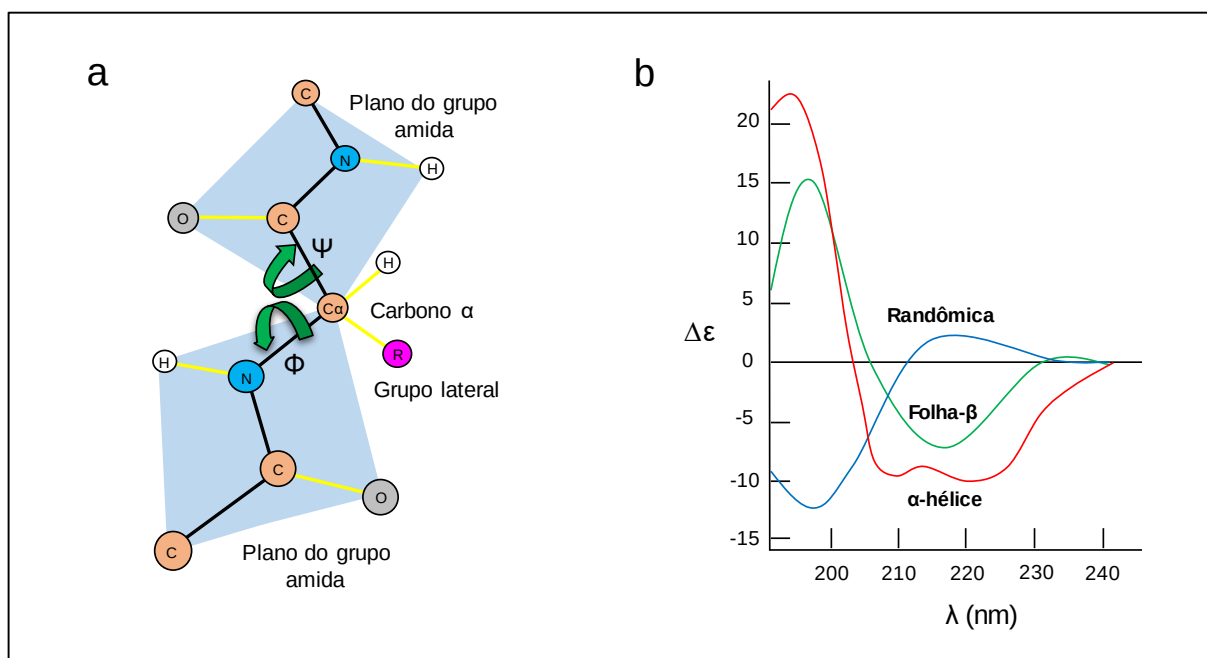
Partindo desse princípio, a espectroscopia de DC é um método bastante explorado no estudo de peptídeos/proteínas, possuindo extensa aplicação. Em virtude do fácil manuseio do aparelho e da possibilidade de submeter a amostra a diferentes

condições de análise, podemos a partir dessa técnica, em poucos minutos, extrair importantes informações sobre a estrutura e estabilidade de uma molécula proteica (CAMPAGNA et al., 2007).

Em um peptídeo, três ligações covalentes separam os carbonos α dos resíduos de aminoácidos vizinhos, arranjo que pode ser descrito por $C\alpha-C-N-C\alpha$. Em função do seu caráter parcial de dupla ligação, as ligações $C-N$ são impedidas de rotacionar livremente. A rotação é possível apenas em torno das ligações $N-C\alpha$ e $C\alpha-C$, em que os ângulos de ligação formados são denominados de Φ (phi) e ψ (psi), respectivamente. Por essa razão, as estruturas secundárias, como hélices α , folhas β e espirais aleatórias, obtidas por ângulos Φ e ψ característicos, são as responsáveis pelos espectros de DC (Figura 6) (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET, 2013).

Logo, as possíveis conformações para um polipeptídeo abrangem qualquer nível estrutural que possa ser alcançado sem que ocorra o rompimento de ligações covalentes. Vale destacar que essas ligações acarretam importantes restrições à conformação da molécula (NELSON; COX, 2011).

Figura 6 - (a) Representação esquemática de uma ligação peptídica, evidenciando os ângulos Φ e ψ . (b) Espectros de dicroísmo circular característicos das estruturas secundárias em α -hélice, folha- β e random-coil.



Fonte: elaborado pelo o autor.

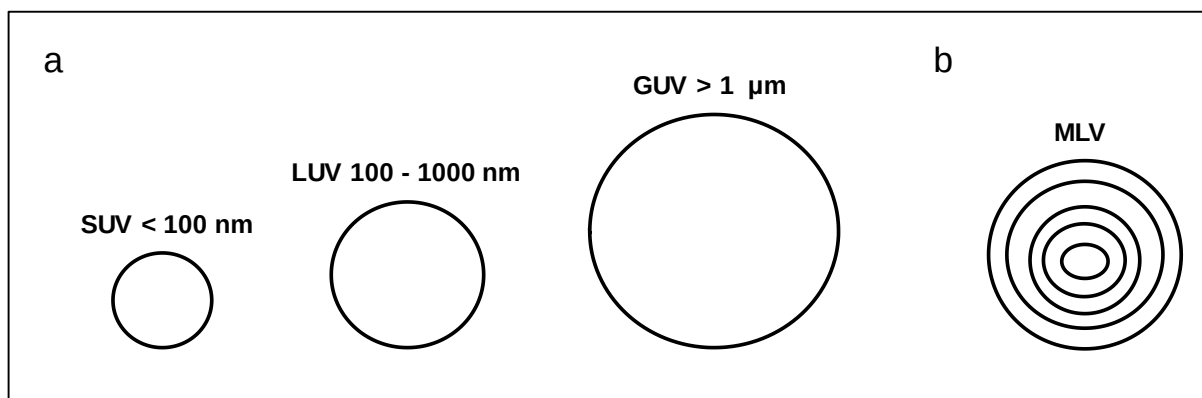
Nesse trabalho, as propriedades conformacionais dos produtos sintetizados foram investigadas por DC em três condições distintas: tampão fosfato-salino 10 mmol.L⁻¹ em pH 7,2 (PBS); tampão PBS + dodecil sulfato de sódio (SDS) (10 mmol.L⁻¹); e tampão PBS + trifluoroetanol (TFE) (60%). A concentração utilizada dos polipeptídeos no ensaio foi de 50 µmol.L⁻¹ (a partir de uma solução estoque quantificada por espectrofotometria de absorção UV), sendo os mesmos solubilizados em tampão PBS.

O experimento foi realizado a temperatura constante de 37°C em um espectropolarímetro JASCO J-815. Para cada espectro houve um acúmulo de 6 varreduras nos comprimentos de onda de 190 a 280 nm, empregando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm.

3.5. Permeabilização de vesículas

As funções biológicas e os mecanismos de atuação de peptídeos/proteínas podem ser investigados *in vitro* com o auxílio de miméticos de membrana. Nessa perspectiva, vesículas unilamelares (Figura 7a) construídas a partir dos principais lipídeos presentes nas membranas celulares de procariotos e eucariotos têm sido amplamente exploradas (AMOS et al., 2016; LORENZÓN et al., 2012).

Figura 7 - Representação esquemática de diferentes lipossomas com relação ao (a) tamanho e (b) número de lamelas. Vesícula unilamelar pequena (SUV); Vesícula unilamelar grande (LUV); Vesícula unilamelar gigante (GUV); Vesícula multilamelar (MLV). Cada linha representa uma bicamada lipídica ou lamela.

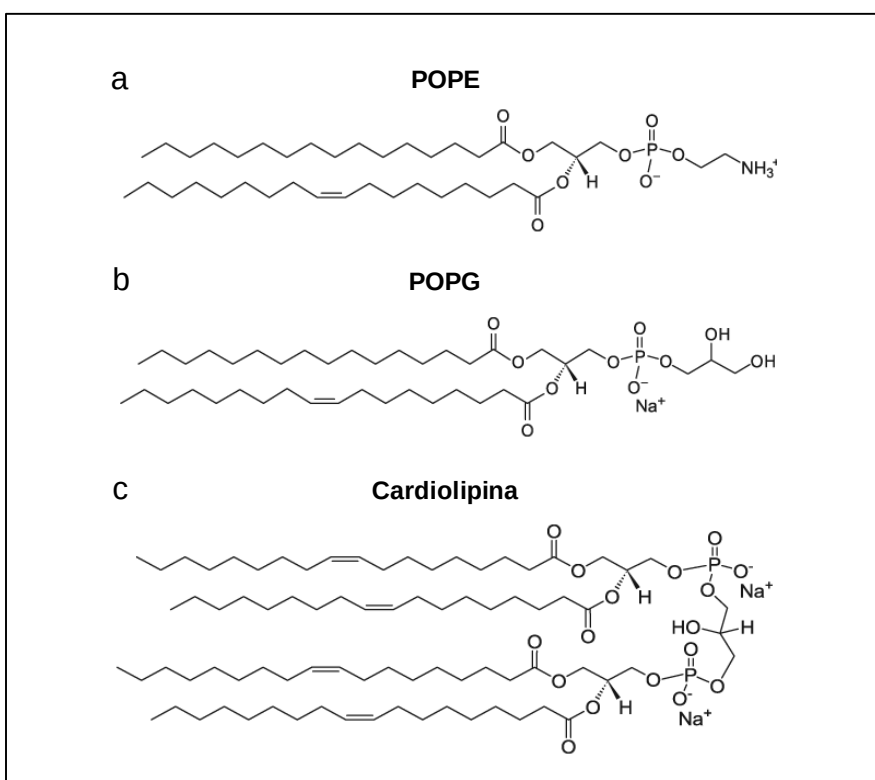


Fonte: elaborado pelo autor.

Para a realização dos ensaios de permeabilização, as moléculas em estudo (nas concentrações de 0,31; 0,62; 1,25 e 2,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, solubilizadas em tampão PBS e 2% de dimetilsulfóxido - DMSO) foram colocadas em contato com vesículas unilamelares grandes (LUVs), formadas por 75% de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-etanolmina (POPE), 22% de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (POPG) e 3% de cardiolipina, contendo o fluoróforo carboxifluoresceína (CF) internalizada (MURZYN; RÓG; PASENKIEWICZ-GIERULA, 2005; TU et al., 2013; VAN GELDER; DUMAS; WINTERHALTER, 2000).

As estruturas dos lipídeos empregados na formação dos lipossomas são representadas na Figura 8.

Figura 8 - Estruturas dos lipídeos utilizados na formação dos lipossomas. (a) POPE, (b) POPG e (c) cardiolipina.



Fonte: adaptado de <https://avantilipids.com>.

Os lipídeos, adquiridos da empresa *Avanti Polar Lipids*, foram pesados e transferidos para um tubo de ensaio na proporção pretendida e dissolvidos com clorofórmio-metanol (4:1). Em seguida, a solução foi evaporada em N₂ de modo a possibilitar a formação de um filme delgado na parede do tubo. Após a formação da

película, o frasco foi mantido sob vácuo durante 12 horas para a eliminação total dos solventes.

Posteriormente, o filme foi hidratado com uma solução aquosa contendo CF 80 mmol.L⁻¹ em tampão PBS havendo inicialmente a formação de vesículas multilamelares (MLVs) (Figura 7b) no sistema. A solução foi submetida a seis ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, banho a 60°C, agitação em vortex e ultrassom, com o intuito de desfazer as múltiplas camadas e diminuir o tamanho das vesículas.

Para produzir as LUVs, as MLVs foram submetidas a um processo de extrusão utilizando um filtro de polycarbonato (*Whatman*) com poros de 100 nm de diâmetro. Foram realizados 30 ciclos de extrusão para homogeneização do tamanho das vesículas. A carboxifluoresceína não incorporada às vesículas (quando presente) foi removida através de filtração em gel utilizando uma coluna Sephadex G-50 estabilizada com tampão PBS.

Para detecção e quantificação, foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência *Cary Eclipse* VARIAN com comprimentos de onda ajustados em 492 nm e 517 nm, correspondentes aos comprimentos de excitação e emissão da CF, respectivamente. O valor de 100% de permeabilização foi obtido pela adição de Triton x-100 (1%), o qual provoca o rompimento total das vesículas e a liberação da CF.

Durante o ensaio, ao se alcançar o primeiro minuto de análise, foi acrescentado ao sistema (constituído pelo tampão PBS e vesículas) o peptídeo/proteína na concentração desejada. Aos 9 minutos, foi adicionado o Triton x-100.

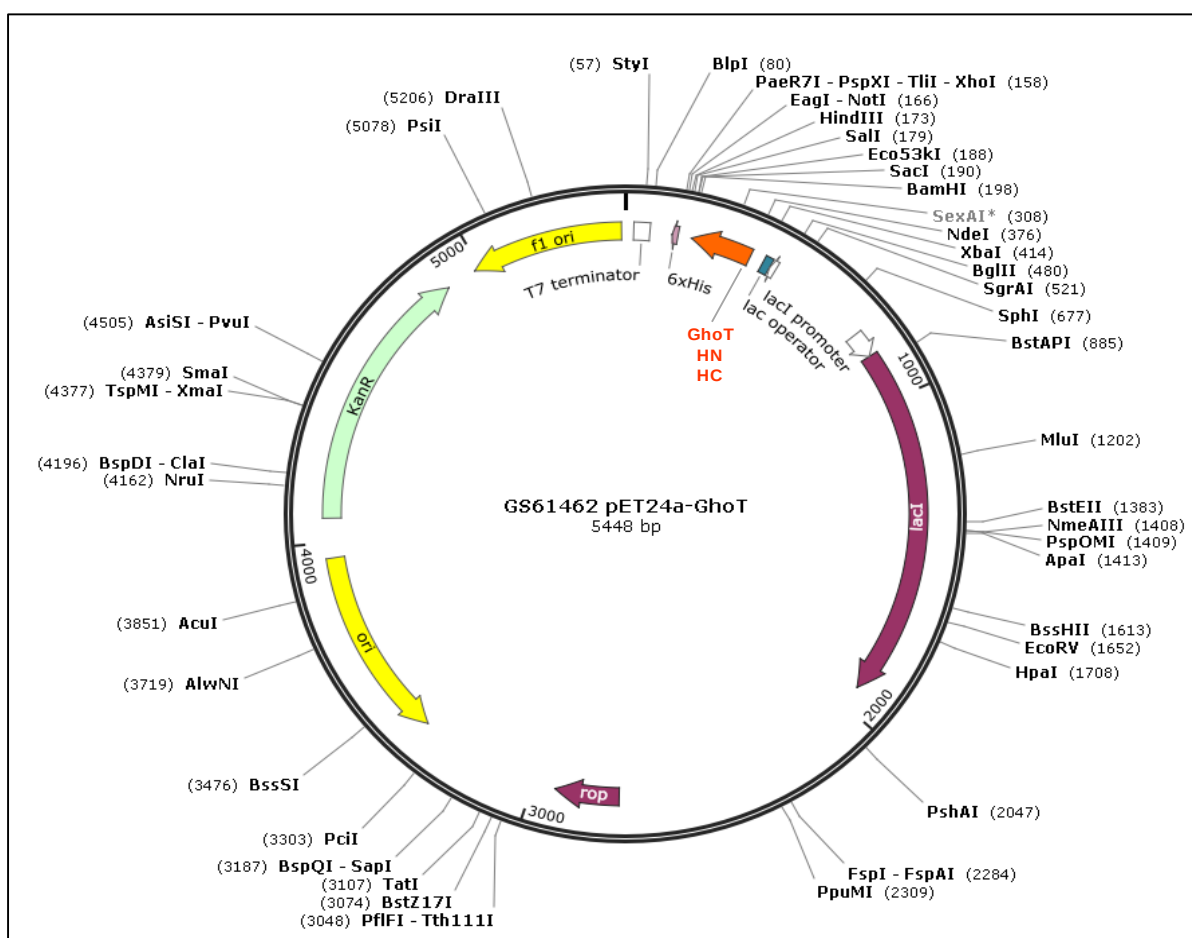
Levando em consideração a instabilidade das vesículas, a suspensão de LUVs foi usada no mesmo dia do seu preparo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.6. Síntese gênica e subclonagem no vetor pET24a

O estudo dos efeitos tóxicos *in vivo* da GhoT de *S. enterica* e derivados foi realizado através da expressão heteróloga dos polipeptídeos em *E. coli*. Para isso, as sequências codificadoras dos polipeptídeos foram sintetizadas pela empresa *GenOne* (<http://www.genone.com.br>), sendo clonadas no vetor pUC e subclonadas no vetor de expressão pET24a (Figura 9).

Embora o plasmídeo pET24a possibilite a produção de polipeptídeos fusionados a uma cauda de poli-histidina, optou-se pela subclonagem em uma região do vetor que permitisse a expressão das moléculas sem a referida cauda. Isso foi feito para evitar possíveis alterações na atividade e no enovelamento dos polipeptídeos e também porque o objetivo não era a purificação dos mesmos.

Figura 9 - Mapa do vetor de expressão pET24a utilizado para a produção heteróloga da proteína GhoT e dos peptídeos HN e HC em *Escherichia coli*.



Fonte: modificado de <http://www.genone.com.br>.

Para a correta expressão das subunidades peptídicas derivadas, a sequência codificadora do peptídeo correspondente a extremidade N-terminal da GhoT de *S. enterica*, chamado de HN, recebeu um códon de parada. Já a sequência codificadora do peptídeo correspondente a extremidade C-terminal da proteína, denominado de HC, ganhou um códon de iniciação. Logo, diferentemente da molécula

HC sintetizada quimicamente, o polipeptídeo HC produzido heterologamente possui em sua extremidade N-terminal um aminoácido metionina.

3.6.1. Transformação bacteriana

As construções plasmidiais obtidas (pET24a-GhoT, pET24a-HN e pET24a-HC) foram utilizadas para transformar a linhagem competente de *E. coli* BL21 (DE3) pLys Rosetta™ (Novagen), para fins de expressão heteróloga intracelular.

Inicialmente, em um tubo tipo Eppendorf, 1 µL de construção plasmidial foi adicionado a 100 µL de uma suspensão de células competentes, sendo o recipiente mantido por 15 minutos em banho de gelo.

A seguir, as misturas foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 2 minutos e, logo depois, acrescidas com 400 µL de meio de cultura 2YT (triptona 1,6%, extrato de levedura 1,0% e NaCl 0,5%) + glicose (0,2 %). Após o acréscimo, os tubos foram condicionados em uma estufa por 1 hora a 37°C para o crescimento das culturas.

Transcorrido o tempo de incubação, os produtos das transformações foram espalhados em placas de Petri contendo o meio 2YT + glicose + ágar (2%), além dos antibióticos canamicina (25 µg.µL⁻¹) e cloranfenicol (25 µg.µL⁻¹). As placas foram então armazenadas novamente em estufa durante 12 horas a 37°C.

O mesmo procedimento foi realizado para o vetor pET24a sem inserto, o qual foi utilizado como controle durante o experimento de expressão.

3.6.2. Expressão heteróloga

Para o ensaio de expressão, após o crescimento em placa das culturas transformadas, foi selecionada uma colônia de cada construção plasmidial. Os clones escolhidos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio 2YT + glicose (0,2%) + canamicina (25 µg.µL⁻¹) e cloranfenicol (25 µg.µL⁻¹) por 12 horas. Em seguida, 1 mL dos tubos foram transferidos para os seus respectivos erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo meio de cultivo. Os frascos foram então incubados em uma estufa sob agitação constante a 37°C até atingirem uma densidade óptica (D.O.) de aproximadamente 0,6.

Alcançada a D.O. estabelecida, as culturas foram induzidas com $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo) por um período de 3 horas. A D.O. durante o experimento foi quantificada a cada 30 minutos com o auxílio de um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata. Como controles negativos foram utilizados: *E. coli* cepa Rosetta desprovida do vetor pET24a; *E. coli* cepa Rosetta transformada com o vetor pET24a “vazio” (sem inserto).

3.7. Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana da GhoT e dos peptídeos derivados foi realizada contra dois microrganismos: *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*, representantes das bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente.

Os ensaios consistiram na incubação das bactérias (*E. coli* O157:H7 ATCC 43895 e *S. aureus* ATCC 14458) por um período de 24 horas em meio de cultura Muller-Hinton (MH) a 37°C . As culturas bacterianas foram padronizadas com o auxílio de um espectrofotômetro ajustado no comprimento de onda de 600 nm, estando as leituras entre 0,08 e 0,10. Posteriormente, as suspensões foram diluídas (1:10) em meio MH, obtendo-se uma concentração de $1,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹, a qual foi utilizada nos ensaios.

A atividade de inibição foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Instituem* (WIKLER et al., 2006). Os poços tiveram um volume final de 100 μL (40 μL de meio de cultivo MH; 10 μL da cultura bacteriana; e 50 μL de peptídeo/proteína, nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, dissolvido em tampão PBS e 2% de DMSO).

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico ciprofloxacina ($80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) (Sigma-N1628). Como controles negativos foram utilizados o meio de cultivo MH + tampão PBS + DMSO (2%). Após o período de incubação, as microplacas foram analisadas em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 600 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Busca da sequência proteica homóloga, alinhamento de sequências e predição estrutural

Muitos genes e proteínas apresentam semelhanças evidentes em suas sequências nucleotídicas e de aminoácidos, respectivamente, as quais são referidas como homologias. Desse modo, assume-se que quaisquer estruturas com homologia, ou seja, com identidade parcial ou até total, podendo ou não ter as mesmas funções, tenham uma origem evolutiva comum (ALBERTS et al., 2010).

Indubitavelmente, a ferramenta mais comum empregada para a busca de similaridades entre trechos, tanto de DNA quanto de polipeptídeos, é o programa BLAST. Através da semelhança identificada pode-se atribuir, ainda que temporariamente, uma possível função a sequência (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Assim, a sequência de aminoácidos da GhoT de *S. enterica*, obtida por BLAST (Figura 10), foi alinhada com a sequência homóloga de *E. coli* (Figura 4) com o objetivo de se determinar o grau de similaridade entre elas.

Figura 10 - Estrutura primária da toxina GhoT de *Salmonella enterica*.

1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55																																													
M	S	L	Y	Q	K	M	L	V	F	Y	A	V	M	A	V	I	S	F	L	I	T	W	F	L	T	H	D	K	K	R	I	R	F	L	S	A	F	L	V	G	A	T	W	P	I	S	F	P	V	A	L	L	F	S	L	F

Fonte: adaptado de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

A partir do alinhamento das sequências (Figura 11), observou-se que os segmentos apresentam predominantemente padrões conservados, com ausência de *gaps*.

Uma das possíveis razões para isso é que após o processo de especiação, onde cada cópia do gene que codifica a proteína GhoT divergiu para as duas espécies, não houve alterações significativas na sequência nucleotídica dos genes explicando a inexistência de deleções ou inserções de aminoácidos nos trechos alinhados.

Outra explicação para a elevada similaridade observada fundamenta-se na transferência horizontal do gene (troca de material genético entre células por um

mecanismo distinto da reprodução) que pode ter ocorrido de uma espécie para outra. A transferência horizontal ou lateral de genes é um evento bastante comum no domínio *Bacteria*, que exerce um papel importante na evolução e adaptação desses organismos ao ambiente. Esse mecanismo, por exemplo, está diretamente vinculado à aquisição de genes de resistência à antibióticos por parte de muitas linhagens bacterianas (DOOLITTLE, 2005; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Figura 11 - Alinhamento global entre as sequências da toxina GhoT de (I) *Escherichia coli* e (II) *Salmonella enterica*, por meio da ferramenta BLAST. *Score*: consiste na nota atribuída pelo algoritmo, baseada no número de pareamentos perfeitos e imperfeitos; *E-value*: valor estatístico que indica se o alinhamento é real ou foi obtido simplesmente pelo acaso no banco de dados; *Identidade*: número de resíduos similares identificados no alinhamento e expresso, em porcentagem, a partir da comparação com o comprimento deste alinhamento. Positivos: soma do número de aminoácidos idênticos e aqueles que são diferentes na comparação, mas que apresentam *Score* positivo na tabela. Aminoácidos não idênticos, mas com propriedades físico-químicas preservadas são considerados como positivos; *Gap*: espaço introduzido em um alinhamento para compensar regiões de inserção ou deleção em uma das duas sequências.

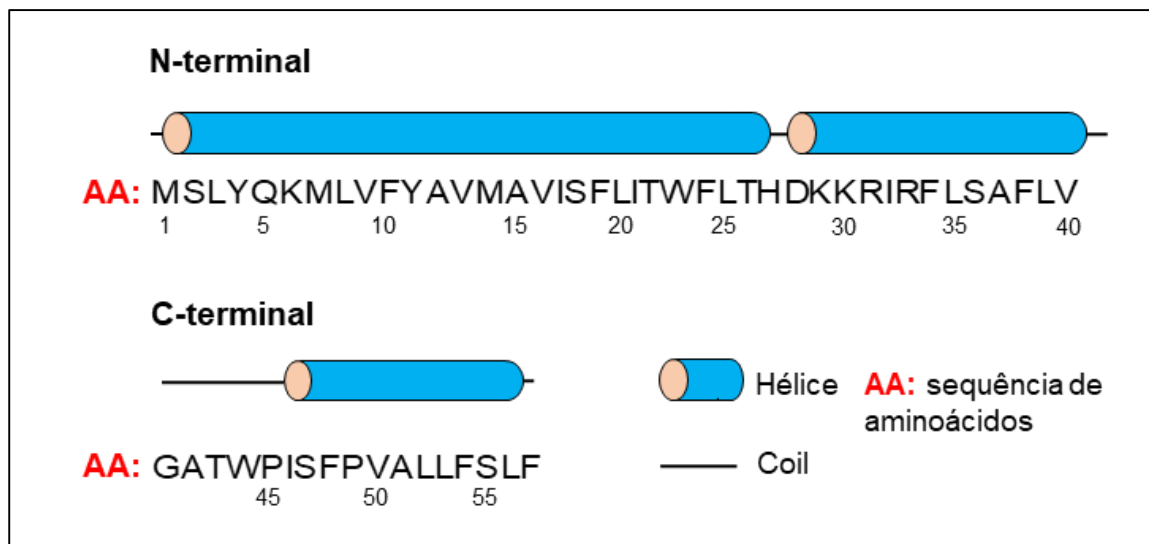
Score	E-value	Identidade	Positivos	Gap
77,8	1e-26	36/57 (63%)	46/57 (80%)	0/57 (0%)
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55				
MALFSKILIFYVIGVNISFV I I W F I S H E K T H I R L L S A F L V G I T W P M S L P V A L L F S L F (I)				
M+L+ K+L+FY + I S F+I W F++H+K I R L S A F L V G T W P+S P V A L L F S L F				
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55				
M S L Y Q K M L V F Y A V M A V I S F L I T W F L T H D K K R I R F L S A F L V G A T W P I S F P V A L L F S L F (I I)				

Fonte: adaptado de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Em seguida, a partir da sequência de *S. enterica*, as estruturas secundárias (Figura 12) e possíveis regiões do polipeptídeo que interagem com a membrana plasmática (Figura 13) foram preditas utilizando o servidor PSIPRED. Adicionalmente, a sua estrutura molecular foi modelada utilizando o servidor Phyre² (Figura 14).

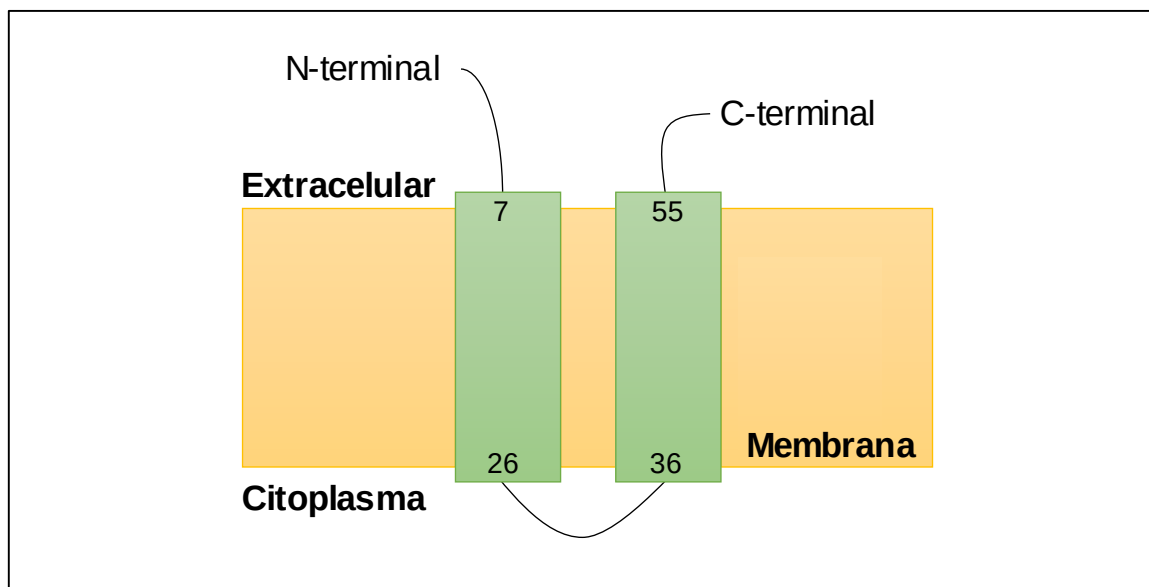
Analisando as Figuras 12, 13 e 14 percebe-se que existem teoricamente duas regiões de α -hélices principais na GhoT, em que cada seção faz uma imersão na membrana. Partindo desses dados, além da proteína completa, foram sintetizados dois peptídeos que correspondem às duas possíveis regiões de interação da molécula com a bicamada lipídica.

Figura 12 - Estruturas secundárias da proteína GhoT de *Salmonella enterica* preditas pelo servidor PSIPRED.



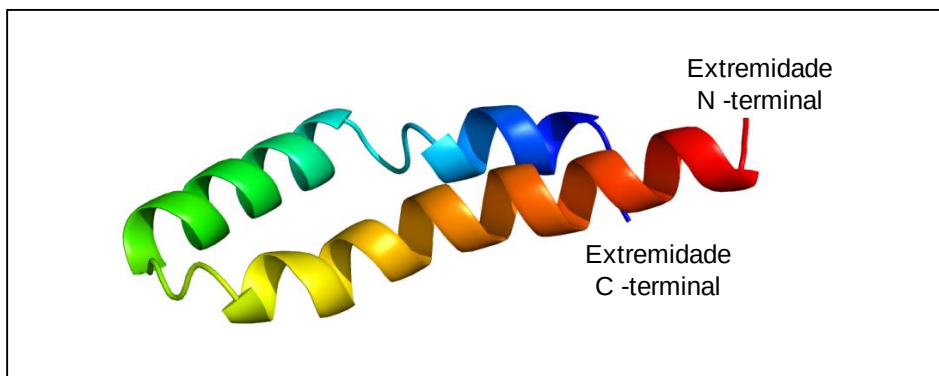
Fonte: adaptado de <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>.

Figura 13 - Possíveis regiões de interação com membrana (retângulos verdes - resíduos de aminoácidos do 7 ao 26 e 36 ao 55) da proteína GhoT de *Salmonella enterica* preditas pelo servidor PSIPRED.



Fonte: adaptado de <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>

Figura 14 - Predição da estrutura molecular da GhoT de *Salmonella enterica* utilizando o servidor Phyre².



Fonte: adaptado de <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>.

As estruturas primárias dos polipeptídeos sintetizados podem ser visualizadas na Figura 15.

Figura 15 - Estrutura primária da proteína (I) GhoT (57 resíduos de aminoácidos) de *Salmonella enterica*, e dos peptídeos (II) HN (extremidade N-terminal) e (III) HC (extremidade C-terminal) que correspondem às possíveis regiões de imersão da toxina com a membrana plasmática (contêm 29 resíduos de aminoácidos cada).

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
(I)	MSLYQKMLVFYAVMAVISFLITWFLTHDKKRIRFLSAFLVGATWPISFPVALLFSLF											
(II)	1	5	10	15	20	25	MSLYQKMLVFYAVMAVISFLITWFLTHDK – Amida					
(III)	Acetil – KKRIRFLSAFLVGATWPISFPVALLFSLF											

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2. Síntese de peptídeos em fase sólida

A proteína GhoT de *S. enterica* e o peptídeo HC foram sintetizados a partir de uma resina Fmoc-Phe-Wang (grau de substituição de $0,39 \text{ mmol.g}^{-1}$), sendo a extremidade N-terminal de HC acetilada ao término da síntese. Já para a construção do peptídeo HN foi utilizada uma resina Rink-amida (grau de substituição de $0,50 \text{ mmol.g}^{-1}$), a qual resulta em peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal após a etapa de clivagem final.

Os resíduos de lisina (K) presentes nas extremidades N-terminal e C-terminal de HC e HN, respectivamente, correspondem originalmente a resíduos internos da

sequência da GhoT, portanto, envolvidos primitivamente em ligações peptídicas. Diante disso, a introdução dos grupamentos acetila e amida foi realizada com o objetivo de mimetizar ligações peptídicas nas regiões de inserção conservando nos peptídeos as características encontradas na proteína.

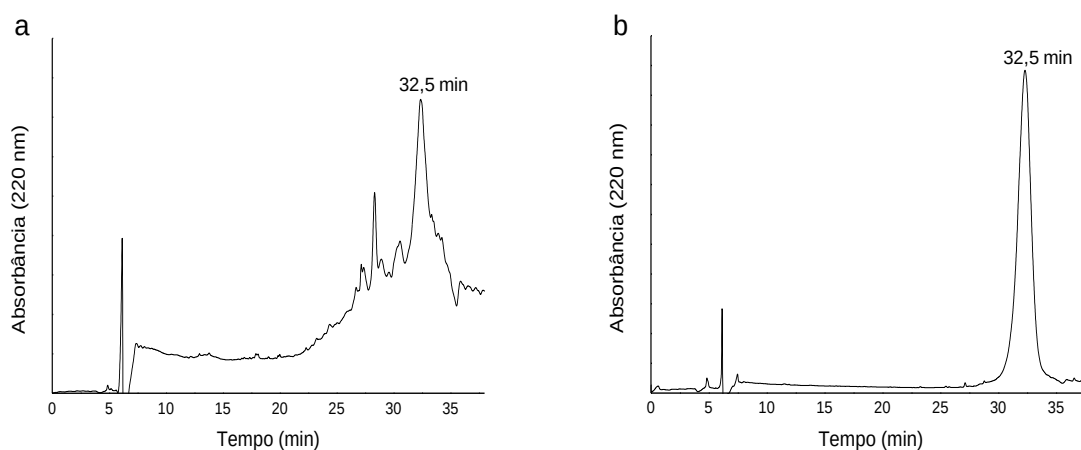
4.3. Purificação e caracterização

Após o processo de síntese e clivagem, uma pequena quantidade de cada polipeptídeo liofilizado foi dissolvida e submetida à análise qualitativa por CLAE-FR. A partir dos resultados obtidos foi definido as condições para a purificação das moléculas em escala semi-preparativa.

As frações advindas da etapa de purificação foram analisadas por CLAE-FR em modo analítico. O conteúdo dos tubos com um perfil cromatográfico aceitável foi agrupado e liofilizado. Posteriormente, uma pequena amostra desse material foi analisada novamente para assegurar a pureza das frações, que se situaram acima de 95%.

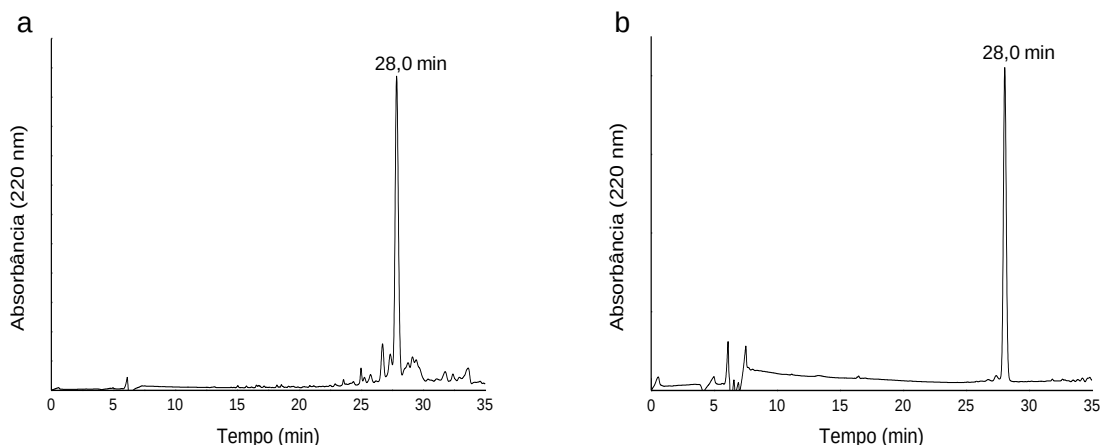
Os perfis cromatográficos das frações antes e após o processo de purificação são apresentados nas Figuras 16 a 18.

Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para a proteína GhoT (a) antes e (b) após a purificação. Coluna de fase reversa *Shimadzu C18* (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 42 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: coluna de fase reversa *Kromasil C8* (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å) com gradiente linear de 50 a 95% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 95 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



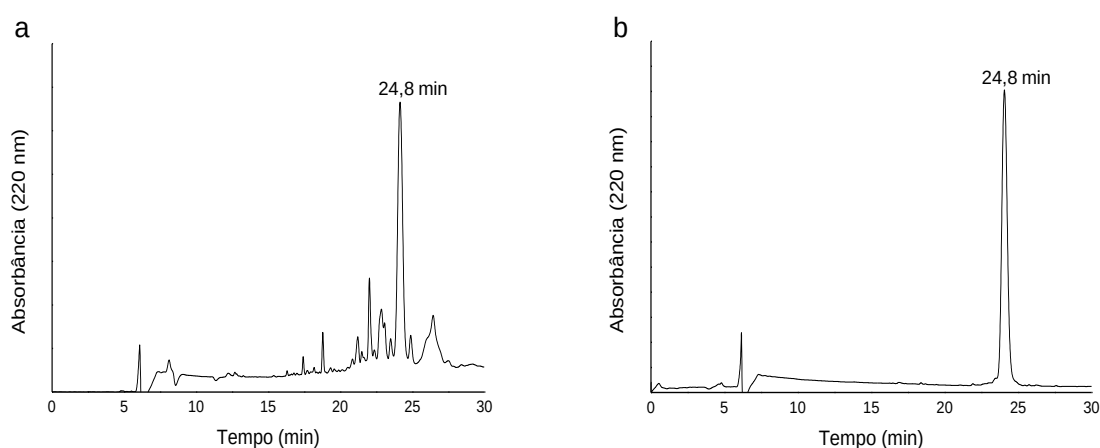
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo HN (a) antes e (b) após a purificação. Coluna de fase reversa *Shimadzu C18* (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 42 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: coluna de fase reversa *Kromasil C8* (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å) com gradiente linear de 20 a 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 60 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo HC (a) antes e (b) após a purificação. Coluna de fase reversa *Shimadzu C18* (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 42 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: coluna de fase reversa *Nucleosil C18* (250 x 10 mm; 10 μ m; 300 Å) com gradiente linear de 5 a 30%, 30 a 75% e 75 a 95%, de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 20, 60 e 10 minutos, respectivamente, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm

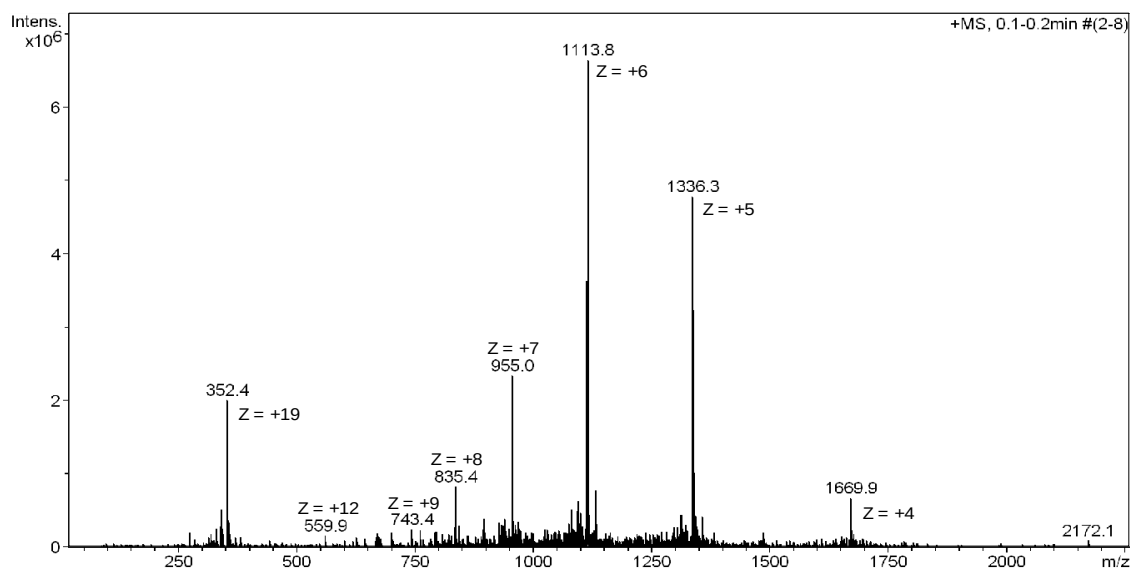


Fonte: elaborado pelo autor.

A confirmação da identidade dos polipeptídeos construídos foi realizada por meio da espectrometria de massas, determinando-se a razão massa molecular/carga

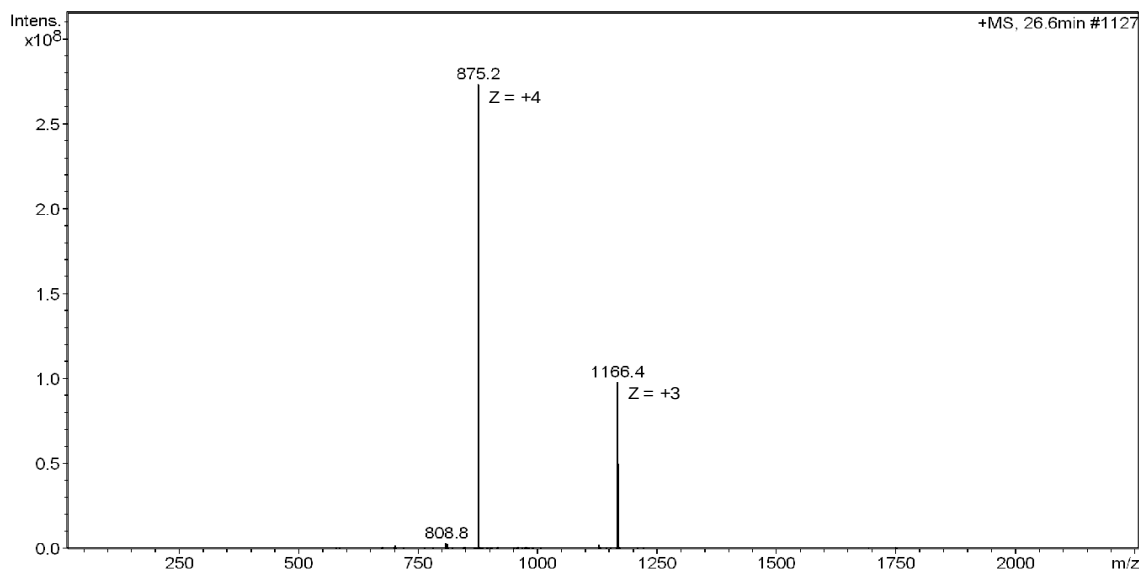
(MM/z) das amostras analisadas. Os espectros de massas obtidos pelo método *eletrospray* positivo [ES m/z: (M + H)⁺] são apresentados nas Figuras 19 a 21.

Figura 19 - Espectro de massas da proteína GhoT pura. Massa molecular: 6.677,6 g.mol⁻¹.



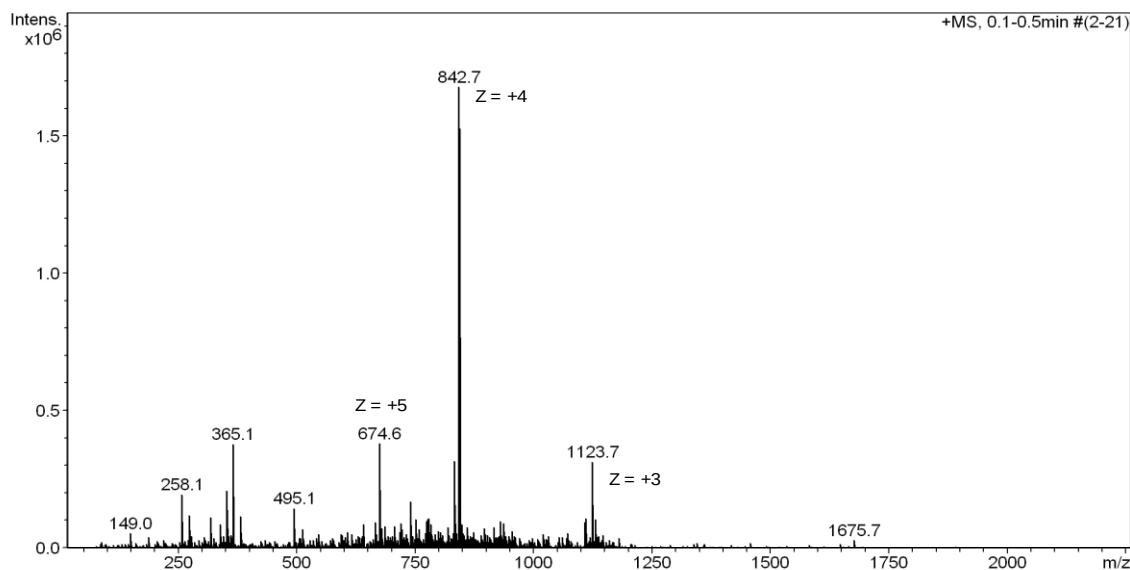
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 20 - Espectro de massas do peptídeo HN puro. Massa molecular: 3.496,26 g.mol⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21 - Espectro de massas do peptídeo HC puro. Massa molecular: 3.368,06 g.mol⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor.

Com base nos espectros de massas constatou-se que os valores MM/z obtidos para a proteína GhoT e peptídeos HN e HC são coincidentes com os valores teóricos calculados (Tabela 2).

Tabela 2 - Razão massa molecular/carga (g.mol⁻¹) teórica calculada para a proteína GhoT de *Salmonella enterica* e peptídeos HN e HC.

Carga (z)	Razão massa molecular/carga teórica (g.mol ⁻¹)		
	GhoT	HN	HC
0	6.677,6	3.496,3	3.368,1
+3	2.226,9	1.166,4	1.123,7
+4	1.670,4	875,1	843,0
+5	1.336,5	700,3	674,6
+6	1.113,9	583,7	562,3
+7	954,9	500,5	482,2
+8	835,7	438,0	422,0
+9	743,0	389,5	375,2
+12	557,5	292,4	281,7
+19	352,5	185,0	178,3

Fonte: elaborado pelo autor.

Dessa maneira, os resultados alcançados por meio da espectrometria de massas juntamente com as análises por CLAE-FR confirmam o sucesso na obtenção e purificação das moléculas desejadas.

4.4. Espectroscopia de dicroísmo circular

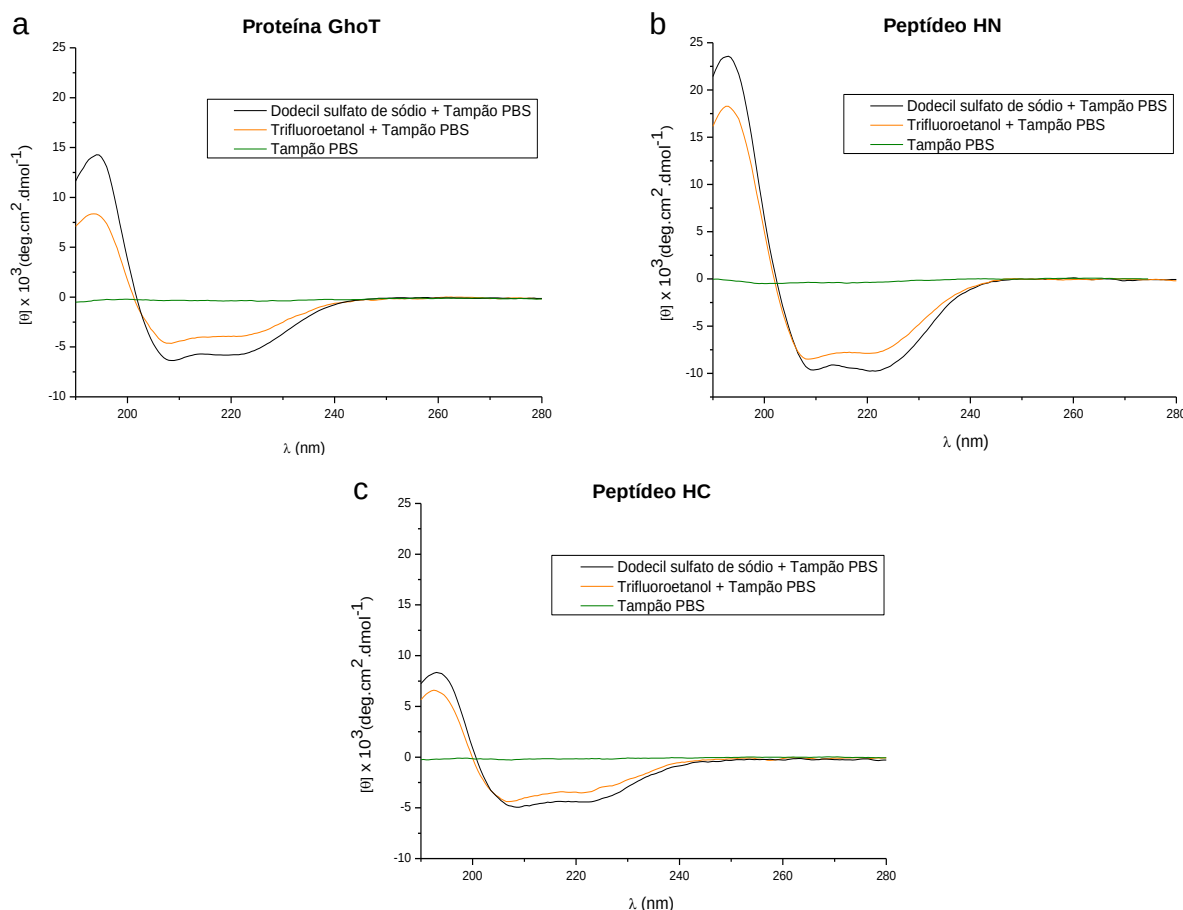
Com o objetivo de confirmar a previsão estrutural obtida *in silico*, os produtos sintetizados foram examinados através da espectroscopia de DC. Em razão de a toxina de *E. coli* atuar *in vivo* a partir do interior celular formando poros na membrana plasmática, para as análises foram empregados os reagentes TFE (solvente indutor de estrutura secundária, explorado para avaliar a capacidade de polipeptídeos em formar hélices) e SDS (surfactante que possui uma cabeça polar com carga negativa e que sob determinadas condições é capaz de formar micelas, mimetizando assim o ambiente encontrado na bicamada lipídica de bactérias).

As medidas de DC obtidas nas diferentes condições propostas são apresentadas na Figura 22. Para a avaliação dos espectros, utilizou-se como referência a Figura 6b.

Inicialmente, os espectros foram traçados apenas na presença de tampão PBS com o intuito de investigar a conformação dos polipeptídeos na ausência de agentes que reconhecidamente podem interferir nas suas estruturações. Nessa situação, os sinais nos espectros para as três moléculas foram praticamente nulos, o que demonstra que os polipeptídeos não possuem atividade óptica em um ambiente predominantemente polar, possivelmente devido ao não dobramento dos mesmos (KELLY; PRICE, 2000; CAMPAGNA et al., 2007).

Por outro lado, tanto em TFE quanto na presença de micelas de SDS a proteína GhoT e os peptídeos HN e HC tiveram uma maior tendência em se estruturarem em α -hélice, visto o aparecimento de duas bandas negativas características próximas a 208 e 222 nm nos espectros, além de uma banda positiva em torno de 195 nm, confirmando a predição computacional. Além disso, comparando as amplitudes dos sinais registrados para as moléculas, esse perfil de estruturação foi mais acentuado para o peptídeo HN (Figura 22b) e menor para HC (Figura 22c).

Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular da proteína (a) GhoT e dos peptídeos (b) HN e (c) HC na presença de tampão fosfato-salino (10 mmol.L⁻¹) pH 7,2 (PBS); tampão PBS + Dodecil sulfato de sódio (SDS) (10 mmol.L⁻¹); e tampão PBS + Trifluoroetanol (TFE) (60%). Concentração dos polipeptídeos: 50 µmol.L⁻¹.



Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre as conformações possíveis para um polipeptídeo, o dobramento em α -hélice é o que melhor otimiza a formação de ligações de hidrogênio internamente à molécula, fornecendo uma maior estabilidade a ela. No caso da GhoT, por exemplo, ao se inserir em uma membrana, a estrutura se torna mais estável devido a diminuição da repulsão entre os grupos hidrofílicos da proteína e os grupamentos apolares da bicamada lipídica, favorecendo a inserção (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET, 2013).

Desse modo, os dados revelados pelas análises de DC evidenciam que a estruturação da proteína GhoT de *S. enterica* e de seus derivados (os quais apresentam uma grande quantidade de grupos apolares) é dependente de um meio hidrofóbico, como o encontrado na membrana de bactérias.

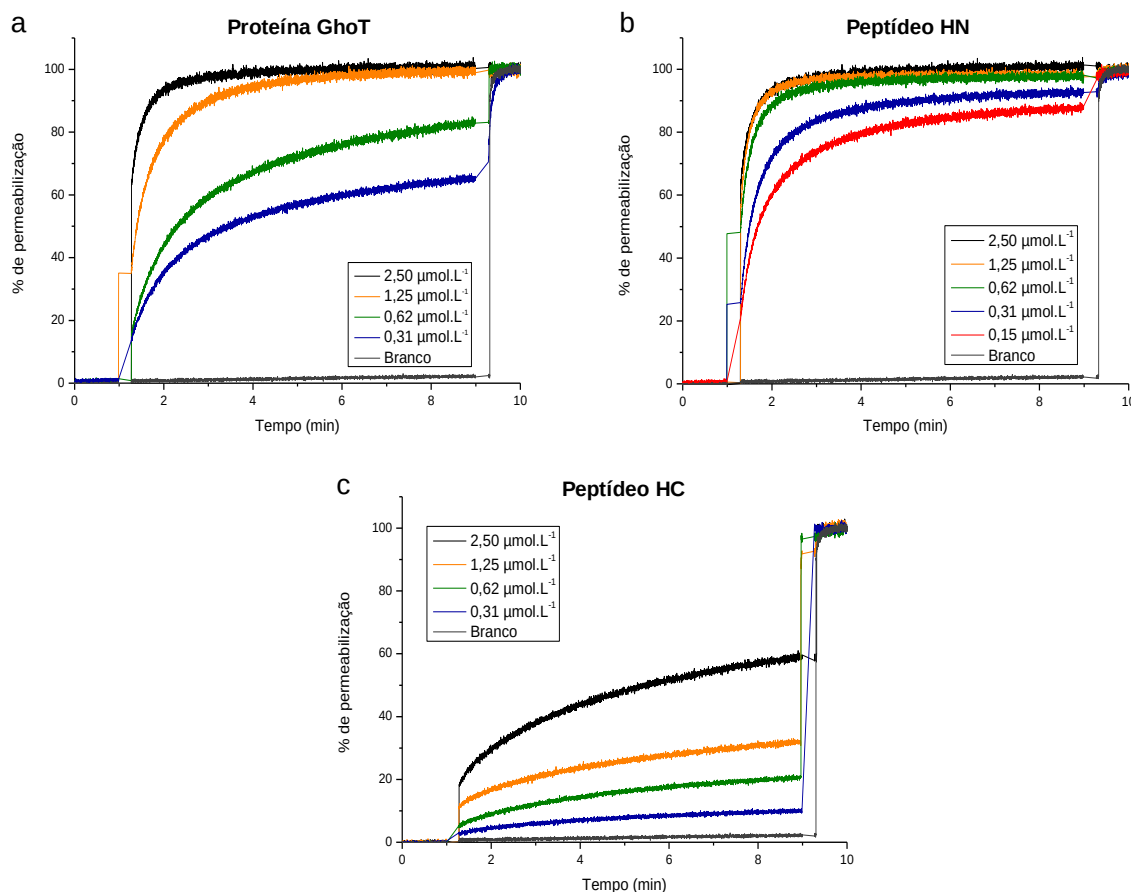
4.5. Permeabilização de vesículas

Para examinar a possível atividade lítica dos polipeptídeos sobre a membrana plasmática de bactérias, foram realizados estudos de permeabilização de LUVs que simulam a bicamada lipídica bacteriana. No processo de confecção das vesículas, o fluoróforo carboxifluoresceína (CF) foi internalizado nos lipossomas.

A CF é uma molécula que emite fluorescência a 517 nm quando excitada a 492 nm. Logo, durante o ensaio, a liberação do composto para o meio externo promove o aumento da intensidade de fluorescência do sistema, o qual é proporcional ao grau de rompimento das LUVs (CHEN; KNUTSON, 1988).

A Figura 23 apresenta os perfis de liberação de CF para as diferentes concentrações das moléculas em análise.

Figura 23 - Perfis de liberação de carboxifluoresceína através da permeabilização de LUVs formadas por POPE (75%), POPG (22%) e cardiolipina (3%) em diferentes concentrações da proteína (a) GhoT e dos peptídeos (b) HN e (c) HC. No tempo de 1 minuto foi acrescentado a proteína/peptídeo na concentração desejada ao sistema constituído pelo tampão PBS 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2) e vesículas. Aos 9 minutos foi adicionado o Triton x-100.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os perfis de liberação mostram uma dependência das taxas de permeabilização com a concentração dos polipeptídeos. Para a GhoT, as porcentagens aproximadas de ruptura das vesículas corresponderam a 64, 83 e 100% quando o teor proteico foi de 0,31, 0,62 e 1,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Contudo, esse comportamento foi mais expressivo para o peptídeo HN, em que as razões centesimais de rompimento das LUVs para as concentrações de 0,15, 0,31 e 0,62 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do polipeptídeo foram cerca de 87, 93 e 100%, respectivamente.

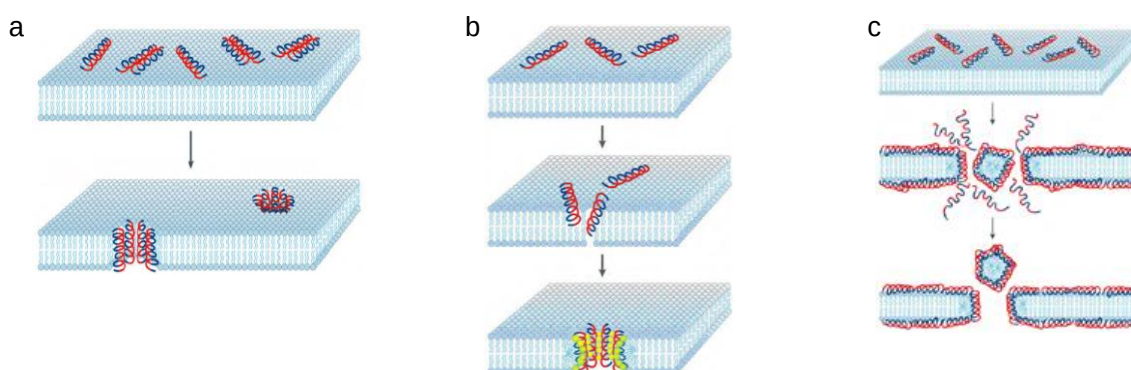
Já o peptídeo correspondente a região C-terminal da proteína foi o que exibiu menores percentuais de permeabilização. A molécula HC rompeu em torno de 9, 21, 31 e 58% dos lipossomas quando as suas concentrações, de modo respectivo, foram de 0,31, 0,62, 1,25 e 2,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Estudos como os de Hugonin et al. (2006), Lorenzón et al. (2012) e Russell et al. (2010) sugerem que a relação existente entre a concentração de um polipeptídeo e o seu perfil de liberação de CF pode indicar o possível mecanismo pelo qual a molécula atua. Propõem-se que uma elevação gradativa da intensidade de fluorescência dependente da concentração do polipeptídeo pode estar relacionada ao mecanismo de formação de poros. Em contrapartida, quando o nível de permeabilização não varia com a concentração da molécula ou oscila pouco pode ser um indicativo do mecanismo denominado de solubilização-carpete (LORENZÓN, et al., 2012; RUSSELL, et al., 2010; ZETH; SANCHO-VAELLO, 2017).

No entanto, as informações fornecidas pelo presente ensaio não são suficientes para se determinar precisamente o mecanismo de ação de um polipeptídeo, sendo necessário para isso a realização de estudos mais detalhados. Ademais, os resultados alcançados demonstram que tanto o produto do gene *ghoT* de *S. enterica* quanto os peptídeos derivados conservam, ao menos *in vitro*, a mesma atividade de membrana verificada *in vivo* para a GhoT de *E. coli* (DAVID; DENNISON; HARRIS, 2012; LORENZÓN, 2015).

Os principais mecanismos que conduzem a permeabilização de bicamadas lipídicas por polipeptídeos são representados na Figura 24.

Figura 24 - Representação dos modelos mais aceitos para a permeabilização de bicamadas lipídicas por peptídeos: (a) modelo forma de barril (formação de poros). As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos polipeptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente; (b) modelo poro toroidal. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos polipeptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, nessa ordem. Em amarelo destaca-se a cabeça polar dos lipídeos participante do poro; (c) modelo de solubilização-carpete como mecanismo de permeabilização da membrana. O acúmulo do polipeptídeo sobre a superfície da membrana ao atingir uma certa concentração acarreta a formação de agregados e micelares com consequente desintegração da bicamada lipídica. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos polipeptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente.



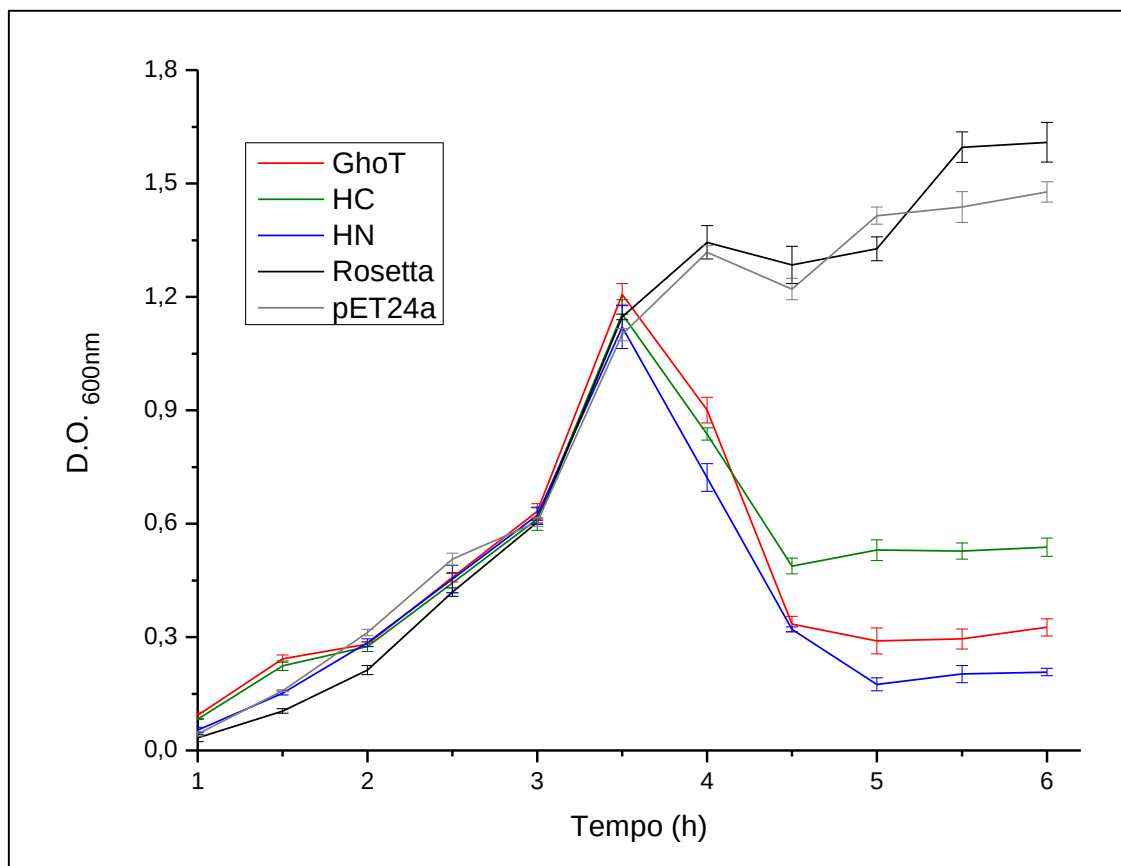
Fonte: adaptado de Brogden (2005).

4.6. Expressão heteróloga

Para a investigação das toxicidades *in vivo* da GhoT de *S. enterica* e dos derivados peptídicos, as sequências que codificam as moléculas foram expressadas heterologicamente em *E. coli*. As curvas de crescimento das culturas bacterianas são apresentadas na Figura 25.

Examinando as curvas de crescimento, verificou-se que após a indução das culturas com IPTG (tempo 3 horas) houve uma diminuição relevante na D.O. medida para as bactérias que produziram a proteína GhoT e os peptídeos HN e HC, como consequência do rompimento celular. No entanto, apesar de todas as moléculas terem provocado o extravasamento do conteúdo citoplasmático bacteriano, esse efeito foi mais proeminente para o peptídeo HN, o qual reduziu drasticamente o número de células quando expresso. Já o peptídeo HC, semelhante ao observado no ensaio de permeabilização de LUVs, foi o que exibiu a menor capacidade de lise.

Figura 25 - Curvas de crescimento para a bactéria competente *Escherichia coli* cepa Rosetta (preto) transformada com os vetores pET24a-GhoT (vermelho), pET24a-HC (verde), pET24a-HN (azul) e pET24a sem inserto (cinza). No tempo 3 horas as culturas foram induzidas com IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo).



Fonte: elaborado pelo autor.

Seguramente, a função que um polipeptídeo desempenha é estritamente dependente da sua conformação espacial que, por sua vez, é determinada pela sequência de aminoácidos que possui. Nesse sentido, os comportamentos verificados para os polipeptídeos podem ser melhor compreendidos analisando as características e distribuição de seus resíduos (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET, 2013).

Comparando as sequências de aminoácidos dos três polipeptídeos, verificou-se que o peptídeo HN é o que apresenta a maior hidrofobicidade, sendo seguido pela GhoT e por HC, respectivamente. Desse modo, aparentemente, os estudos realizados direcionam para uma relação direta entre hidrofobicidade, estruturação e permeabilização.

A maior estruturação e atividade apresentada por HN pode ser explicada em função do seu grande número de aminoácidos hidrofóbicos e da presença de cargas positivas em suas extremidades (K6 e K29) que favorecem a interação entre a

molécula e a membrana negativa. No caso do peptídeo HC, apesar de o mesmo apresentar uma alta densidade de cargas positivas na sua extremidade N-terminal (K1, K2, R3 e R5), a estrutura apresenta menor hidrofobicidade e a sua extremidade C-terminal exibe uma carga negativa, a qual reduz a atração eletrostática dessa região com a bicamada lipídica/micela, podendo justificar o seu menor enovelamento e capacidade lítica (ALVARES, et al., 2016; LEE; HALL; AGUILAR, 2016; ZETH; SANCHO-VAELLO, 2017).

Com relação a GhoT, a mesma apresentou propriedades intermediárias quando comparada aos seus derivados. Uma possível explicação para isso é que a proteína possui características tanto de HN quanto de HC, em virtude de ser formada basicamente pela junção das duas moléculas.

Não obstante, no trabalho de Cheng et al. (2014) foi demonstrado que a substituição do aminoácido fenilalanina (posição 38) pelo aminoácido arginina na sequência da GhoT de *E. coli*, resultou na perda da toxicidade da proteína. Porém, no presente estudo constatou-se que o polipeptídeo homólogo (63% de identidade) encontrado em *S. enterica* e os peptídeos HN e HC mantêm a atividade lítica verificada para a toxina de *E. coli*.

Assim, baseando-se na estreita relação entre a GhoT de *E. coli* e a persistência bacteriana, os resultados apresentados sugerem que o produto do gene *ghoT* de *S. enterica* pode estar associado à formação de células persistentes no gênero *Salmonella* (CLAUDI et al., 2014; DE LA CRUZ et al., 2013; SLATTERY et al., 2013).

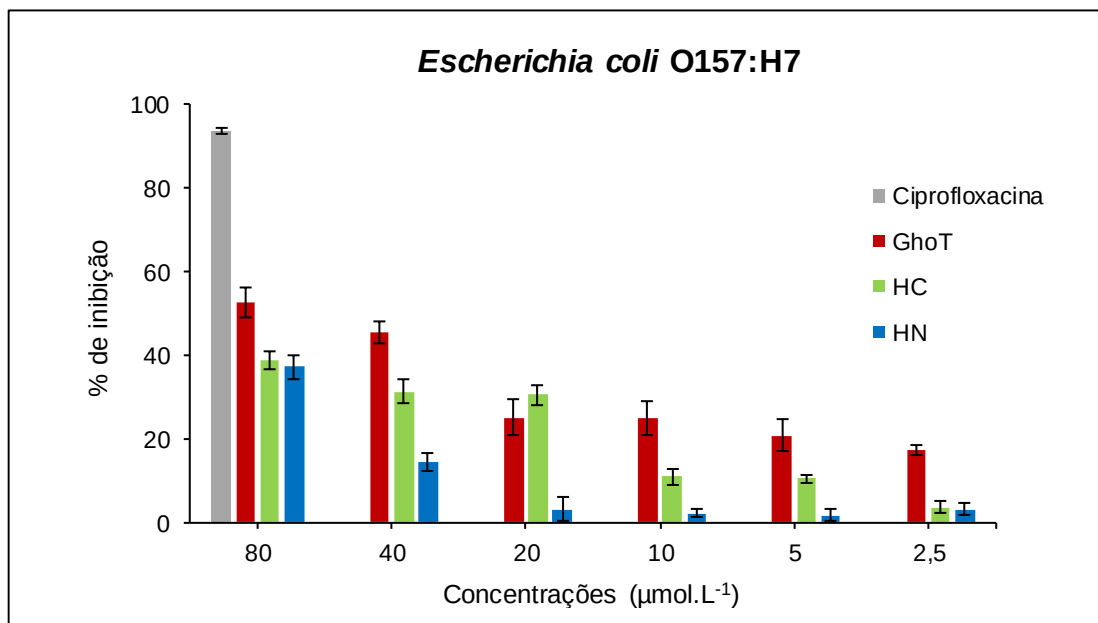
4.7. Atividade antibacteriana

A avaliação do grau de turbidez de um determinado meio de cultura líquido é uma forma eficiente de monitorar o crescimento bacteriano. À medida que as bactérias vão se multiplicando o meio de cultivo vai se tornando mais turvo devido a maior concentração de células existente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Logo, seguindo esse princípio, foi estimada a capacidade de inibição do crescimento bacteriano das três moléculas em estudo quando adicionadas ao meio de cultivo.

Para a bactéria gram-negativa *E. coli* O157:H7 (Figura 26) observou-se que todos os polipeptídeos inibiram consideravelmente o seu desenvolvimento na concentração de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, com destaque para a proteína GhoT que inibiu o crescimento em aproximadamente 50%. Já para os peptídeos HN e HC a diferença

entre eles não foi expressiva nessa concentração, ficando a inibição próxima de 40% para ambos. Contudo, para concentrações menores a atividade de HN decaiu notavelmente atingindo valores próximos de zero.

Figura 26 - Atividade antibacteriana da proteína GhoT (vermelho) de *Salmonella enterica* e dos peptídeos HC (verde) e HN (azul) frente a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* O157:H7. Controle positivo: ciprofloxacina (cinza) (80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).



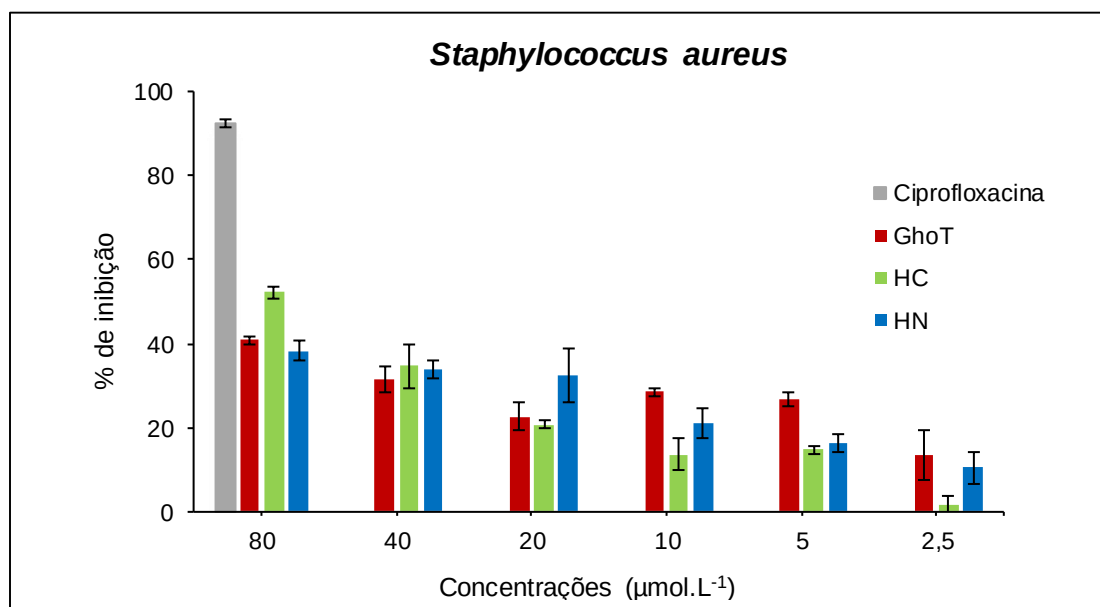
Fonte: elaborado pelo autor.

Bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa composta fundamentalmente por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolípidos, a qual exibe forte carga negativa. Estudos como o de Hancock e Scott (2000) sugerem que a adição de peptídeos catiônicos (como as moléculas analisadas) no meio extracelular, causa o deslocamento dos íons magnésio e cálcio que estabilizam a membrana externa, desse modo, facilitando a interação dos polipeptídeos com a membrana plasmática (MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP, 2010).

Com relação a bactéria gram-positiva *S. aureus* (Figura 27), constatou-se que as três moléculas também interferiram na multiplicação do microrganismo de maneira considerável. Na maior concentração utilizada se destacou o peptídeo HC, o qual reduziu em mais de 50% o crescimento bacteriano, enquanto que o peptídeo HN manteve o seu nível máximo de inibição próximo de 40% (como visto para a

representante gram-negativa). Já a GhoT na concentração de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ exibiu uma atividade inibitória um pouco menor quando comparada àquela observada em *E. coli*.

Figura 27 - Atividade antibacteriana da proteína GhoT (vermelho) de *Salmonella enterica* e dos peptídeos HC (verde) e HN (azul) frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Controle positivo: ciprofloxacina (cinza) (80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).



Fonte: elaborado pelo autor.

Em função da elevada capacidade da proteína GhoT e do peptídeo HN de romperem bicamadas lipídicas (constatada nos estudos de permeabilização e expressão), poderia se esperar para as duas moléculas uma atividade antibacteriana superior as apresentadas. Todavia, para desempenharem as suas atividades nesse caso, os polipeptídeos precisam transpor primeiramente estruturas complexas (como a parede celular bacteriana) que estão ausentes nos lipossomas e no interior da célula. Dessa maneira, quando o peptídeo/proteína se encontra inicialmente no meio extracelular essas barreiras podem impedir que as moléculas atinjam a membrana citoplasmática e promovam, conseqüentemente, os seus efeitos tóxicos (HE; KRAUSON; WIMLEY, 2014; PAPO; SHAI, 2003).

Portanto, é conveniente ressaltar que os resultados exibidos nesse experimento não contradizem os dados alcançados nos ensaios anteriores. Além disso, as informações reveladas pelo teste antibacteriano demonstram que as

moléculas, mesmo atuando a partir do meio externo, continuam sendo tóxicas, reduzindo o crescimento tanto da bactéria gram-negativa quanto da gram-positiva.

5. CONCLUSÕES

- A obtenção da GhoT de *S. enterica* por síntese química foi uma realização inédita;
- Os resultados alcançados para a GhoT de *S. enterica* confirmam a sua predição estrutural em α -hélice e atividade sobre a membrana plasmática bacteriana;
- A proteína GhoT de *S. enterica* pode estar associada a ocorrência do fenômeno de persistência celular no gênero *Salmonella*;
- Os peptídeos derivados produzidos conservam o perfil de estruturação da GhoT e a sua capacidade lítica, porém em concentrações variáveis;
- Os polipeptídeos foram tóxicos para bactérias tanto intracelularmente (quando expressos heterologicamente) quanto extracelularmente (quando adicionados ao meio de cultura);
- As informações reveladas exibem o potencial uso da toxina de *S. enterica* e derivados como modelos para o desenvolvimento de novos antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAKRE, C. D. et al. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. **Mol. Cell.**, v. 52, n. 5, p. 617-628, 2013.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- ALLISON, K. R.; BRYNILDSEN, M. P.; COLLINS, J. J. Heterogeneous bacterial persists and engineering approaches to eliminate them. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 14, n. 5, p. 593-598, 2011.
- ALVARES, Dayane S. et al. The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1858, n. 2, p. 393-402, 2016.
- AMOS, S. B. et al. Antimicrobial peptide potency is facilitated by greater conformation flexibility when binding to gram-negative bacterial Inner membranes. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 37639, 2016.
- BANIN, E.; HUGHES, D.; KUIPERS, O. P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 41, n. 3, p. 450-452, 2017.
- BARBOSA, L. C. B. et al. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2014.
- BIGGER, J. W. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. **Ir. J. Med. Sci.**, v. 19, n. 11, p. 553-568, 1944.
- BLOWER, T. R. et al. Identification and classification of bacterial Type III toxin antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 13, p. 6158-6173, 2012.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.
- BUSTAMANTE, P.; IREDELL, J. R. Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. **Plasmid**, v. 91, p. 19-27, 2017.
- CAMPAGNA, S. et al. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. **Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1771-1778, 2007.
- CHEN, R. F.; KNUTSON, J. R. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers. **Anal. Biochem.**, v. 172, n. 1, p. 61-77, 1988.
- CHENG, H-Y. et al. Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. **Environ. Microbiol.**, v. 16, n. 6, p. 1741-1754, 2014.

CLAUDI, B. et al. Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 722-733, 2014.

CORRECIRC, D. H.; RAMOS, C. H. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **Afr. J. Biochem. Res.**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.

DAVID, A. P.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. **Antimicrobial peptides**. Weinheim: Wiley, 2012. 270 p.

DE LA CRUZ, M. A. et al. A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 12, p. 1-13, 2013.

DOOLITTLE, R. F. Evolutionary aspects of whole-genome biology. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 15, n. 3, p. 248-253, 2005.

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochem. Pharmacol.**, v. 133, p. 152-163, 2017.

FOZO, E. M. et al. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 11, p. 3743-3759, 2010.

GALÁN, J. E. Typhoid toxin provides a window into typhoid fever and the biology of *Salmonella* Typhi. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 113, n. 23, p. 6338-6344, 2016.

GBEJUADE, H. O.; LOVERING, A. M.; WEBB, J. C. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections: a review. **Acta Orthop.**, v. 86, n. 2, p. 147-158, 2015.

GERDES, K.; CHRISTENSEN, S. K.; LØBNER-OLESEN, A. Prokaryotic toxin antitoxin stress response loci. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 5, p. 371-382, 2005.

GERMAIN, E. et al. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 112, n. 16, p. 5171-5176, 2015.

HALL, A. M.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 36, p. 102-110, 2017.

HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, n. 16, p. 8856-8861, 2000.

HE, J.; KRAUSON, A. J.; WIMLEY, W. C. Toward the de novo design of antimicrobial peptides: Lack of correlation between peptide permeabilization of lipid vesicles and antimicrobial, cytolytic, or cytotoxic activity in living cells. **Pept. Sci.**, v. 102, n. 1, p. 1-6, 2014.

HELAINE, S.; KUGELBERG, E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. **Trends Microbiol.**, v. 22, n. 7, p. 417-424, 2014.

HUGONIN, L. et al. Membrane leakage induced by dynorphins. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 13, p. 3201-3205, 2006.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides. **Anal. Biochem.**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KATES, S. A.; ALBERICIO, F. **Solid-phase synthesis: a practical guide**. 1. ed. New York: CRC Press, 2000. 848 p.

KĘDZIERSKA, B.; HAYES, F. Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 790, 2016.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Curr. Protein. Pept. Sci.**, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000.

KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, n. 1, p. 13-18, 2004.

KORCH, S. B.; HENDERSON, T. A.; HILL, T. M. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p) ppGpp synthesis. **Mol. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 1199-1213, 2003.

LEE, T-H.; HALL, K. N.; AGUILAR, M-I. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 16, n. 1, p. 25-39, 2016.

LEPLAE, R. et al. Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 3, n. 5, p. 371-384, 2011.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2007.

LORENZÓN, E. N. et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

LORENZÓN, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2**. 2015. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

MACHADO, A. et al. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAISONNEUVE, E.; CAMARGO, M. C.; GERDES, K. (p) ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. **Cell.**, v. 154, n. 5, p. 1140-1150, 2013.

MASUDA, H.; INOUE, M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 140, 2017.

MASUDA, H. et al. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 84, n. 5, p. 979-989, 2012.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MOYED, H. S.; BERTRAND, K. P. hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 155, n. 2, p. 768-775, 1983.

MURZYN, K.; RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Phosphatidylethanolamine phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. **Biophys. J.**, v. 88, n. 2, p. 1091-1103, 2005.

NAGHMOUCHI, K. et al. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. **Res. Microbiol.**, v. 163, n. 2, p. 101-108, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1328 p.

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nat. Chem. Biol.**, v. 12, n. 4, p. 208-214, 2016.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003.

PAYNE, D. J. Desperately seeking new antibiotics. **Science**, v. 321, n. 5896, p. 1644-1645, 2008.

ROBERTS, A. E. L. et al. The limitations of in vitro experimentation in understanding biofilms and chronic infection. **J. Mol. Biol.**, v. 427, n. 23, p. 3646-3661, 2015.

RUSSELL, A. L.; KENNEDY, A. M.; SPUCHES, A. M.; VENUGOPAL, D.; BHONSLE, J. B.; HICKS, R. P. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. **Chem. Phys. Lipids**, v. 163, n. 6, p. 488-497, 2010.

SCHUMACHER, M. A. et al. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 59-64, 2015.

SLATTERY, A. et al. Isolation of highly persistent mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a new toxin-antitoxin module. **J. Bacteriol.**, v. 195, n. 4, p. 647-657, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 964 p.

TU, Y. et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. **Nat. Nanotech.**, v. 8, n. 8, p. 594-601, 2013.

VAN GELDER, P.; DUMAS, F.; WINTERHALTER, M. Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes. **Biophys. Chem.**, v. 85, n. 2, p. 153-167, 2000.

VAN MELDEREN, L. Microbiology: GhoSTly bacterial persisters. **Nat. Chem. Biol.**, v. 8, n. 10, p. 812-813, 2012.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1512 p.

WANG, X. et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. **Nat. Chem. Biol.**, v. 8, n. 10, p. 855-861, 2012.

WANG, X.; WOOD, T. K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 16, p. 5577-5583, 2011.

WIKLER, M. A. et al. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard**. 9. ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. 52 p.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 403 p.

ZETH, K.; SANCHO-VAELLO, E. Human antimicrobial peptides show novel distinct pathways in membrane interactions. **Front. Chem.**, v. 5, p. 86, 2017.