

GABRIEL SOARES GUERRA

**Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC
utilizando anticorpos**

São Paulo
2019

GABRIEL SOARES GUERRA

**Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC
utilizando anticorpos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Balan

Versão Original

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Soares Guerra, Gabriel
Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de
transportadores ABC utilizando anticorpos / Gabriel
Soares Guerra; orientador Andrea Balan. -- São
Paulo, 2019.
95 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Transportadores ABC. 2. Escherichia coli. 3.
Staphylococcus aureus. 4. Inibição mediada por
anticorpo. 5. proteína de membrana. I. Balan, Andrea
, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriel Soares Guerra

Título da Dissertação: Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC utilizando anticorpos.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Balan

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.31.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **50/2014/CEUA**, válido até 10/06/2018, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, do Departamento de **Microbiologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Gabriel Soares Guerra** ao Projeto de Pesquisa "*Controle de tumores induzidos pelo vírus papiloma humano (HPV-16) por abordagens vacinais terapêuticas*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 08 de março de 2018.

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Dedico esse trabalho à Adriana Roceti, pelo apoio incondicional e integral durante o meu mestrado e por ser a melhor parte de mim.
Obrigado por tudo nenis, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Andrea Balan, agradeço imensamente pela paciência e maestria em repassar seu conhecimento a mim nos últimos 2 anos e meio. Muito obrigado por me aceitar no seu grupo de pesquisa e por sua dedicação em tornar todos nós, seus alunos, melhores profissionais a cada dia sempre com leveza e muito bom humor. Será para sempre um exemplo de profissional e ser humano para mim.

Agradeço aos meus pais Daniella e Osmar e meu irmão Thiago, que apesar de qualquer adversidade ou desentendimento, que não foram poucos, nunca deixaram de acreditar em mim e contribuir, cada qual a sua forma e no seu momento, com a minha criação e sucesso profissional. Serei eternamente grato aos três sempre e os amo muito.

À Adriana Roceti, Caio Patané, Isabella Frazão, Julia Boselli, Giulianna Sá, Ilze Olivi, Pedro Zorzanelli, Letícia Penna, Maria Carolina Vieira, Isabela Morato, Jaquelinne Bassi, Fernanda Mansano, Rayra Dituri, Marília Menegatto, Letícia Tiburcio, Geovana Azeredo e Veronica Lopez. Meus amigos sempre foram e sempre serão minha segunda família, e eu não poderia deixar de agradecer a cada um de vocês pelo apoio e carinho nesses últimos dois anos. Seria totalmente impossível sem vocês. Muito obrigado!

Agradeço a todos os atuais e ex integrantes do LBEAT, Andréia Navarro, Cristiane Tambascia, Marcelo Barreto, Danilo Macedo, Giovana Baroni e Cindy Lee Cajachagua pela parceria durante a realização desse trabalho. Agradeço em especial à Brenda Anderson por aguentar meu excelente bom humor todas as manhãs, Lilia Iriarte pela ajuda tremenda no início do meu projeto e nossas aventuras perdidos em Londres, Sindy Cabarca pela amizade e boas risadas e finalmente à Pâmela Pena por ser até hoje um exemplo de dedicação e de pessoa além de parceira no nosso primeiro artigo! Obrigado a todos, foi um prazer enorme trabalhar com cada um de vocês.

Agradeço ao Dr. Marko Hyvonen pela ajuda nas etapas iniciais desse projeto e por sempre tirar minhas dúvidas quando necessário.

Ao professor Dr. Luis Carlos e todos os integrantes do seu grupo de pesquisa

que me auxiliaram em diferentes etapas desse projeto, Lennon, Nayara, e principalmente Dra. Ana Carolina Moreno por toda a ajuda.

À professora Dra. Roxane Piazza, pelo fornecimento dos anticorpos.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo. Agradeço imensamente a todos os professores e funcionários que conheci e que de alguma forma contribuíram com minha formação.

Agradeço especialmente ao Tadeu e professores Dr. Nilton Lincopan, Dr. Carlos Tabora e Dr. Paolo Zanotto, com os quais aprendi muito durante meu estágio PAE em 2018.

Agradeço à FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço por fim à CAPES pela bolsa de mestrado, que proporcionou minha dedicação integral á esse trabalhos nos últimos dois anos.

Meu muito obrigado a todos!

Este projeto foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada, no Instituto de Biomédicas II, departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (USP), sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), processo 2015/14514-1, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), processo 401505/2016-2 e Fundação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Programa PROEX Processo 1708358.

RESUMO

GUERRA, G. S. **Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC utilizando anticorpos** 2019. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP Binding Cassette*), estão entre os principais complexos proteicos responsáveis pelo fluxo de moléculas contra um gradiente de concentração pela membrana plasmática. As funções atribuídas à esta família proteica vão desde o transporte *per se*, como nutrição, virulência, patogênese até resistência à drogas, em procariotos e eucariotos. Devido à pluralidade de funções, tais complexos têm sido alvo de extensos estudos para a compreensão do seu papel, funcional e estrutural, nos mecanismos de resistência. Transportadores ABC do tipo importadores, presentes somente em procariotos, são constituídos de duas permeases formadoras de um poro na membrana, duas ATPases que fornecem energia para a quebra do ATP e um componente adicional quando comparado aos exportadores, que é uma proteína ligadora de substrato responsável pela captura e entrega do substrato a ser transportado nas permeases na membrana. Esta interação é essencial e fundamental para a especificidade e velocidade do transporte, além de induzir mudanças conformacionais que ativam o transporte. Sem a interação da proteína ligadora, não há transporte. Baseados neste dado e no fato que importadores estão presentes somente em procariotos, este projeto visa definir um modelo de inibição desses sistemas baseado na produção de anticorpos contra diferentes transportadores ABC das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de forma a bloquear a interação entre permeases e proteínas ligadoras de substrato. Para tal, regiões de permeases que devem interagir com as proteínas ligadoras foram expressas utilizando o sistema *Rad Display* para posterior produção de anticorpos contra as mesmas. Neste sistema, as sequências de interesse foram extensivamente analisadas por bioinformática e posteriormente clonadas no interior do gene *radA* de *Pyrococcus furiosus*, sendo expressas como proteínas quiméricas sempre solúveis. As proteínas, doravante denominadas “RAD-loops”, foram então purificadas por meio de cromatografia de troca catiônica seguida de exclusão molecular e usadas para produção de anticorpos. Ensaio de ELISA indireto foram realizados para determinar o título de anticorpos nos soros de animais imunizados com as proteínas Rad+loop e, posteriormente, uma série de ensaios incluindo *western blotting*, *whole cell elisa* e imunofluorescência caracterizaram a interação dos anticorpos com seus respectivos alvos ABC. Por fim, foi realizado ensaio de inibição utilizando meio mínimo de crescimento na presença das igGs para determinar a influência das mesmas no crescimento bacteriano. Os resultados apresentados neste trabalho são de grande importância uma vez que são inéditos devido ao uso de permeases como alvo para inibição de ABCs, o que será extremamente relevante para o desenvolvimento de novas estratégias que visem bloquear ação desses complexos proteicos vitais para a manutenção da homeostase celular e vastamente disseminados tanto em procariotos como eucariotos.

Palavras chave: Transportadores ABC. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Inibição mediada por anticorpos. Proteína de membrana.

ABSTRACT

GUERRA, G. S. **Development of an inhibition strategy for ABC transporters utilizing antibodies.** 2019. 92 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ABC transporters (*ABC binding cassette*) are among the main protein complexes responsible for the traffic of molecules against a concentration gradient across the plasmatic membrane. The roles given to this protein family go from transport itself to nutrition, virulence, pathogenesis and even drug resistance, in prokaryotic and eukaryotic organisms. Due to its plurality of functions, they have been targets for several studies aiming the comprehension of its role, functional and structural, regarding the resistance mechanisms. ABC transporters from the importação class, which are found only in prokaryotic organisms, are formed by two permease proteins that together create a pore in the membrane, two ATPase proteins that give the necessary energy for the ATP breakdown and an additional component when compared to ABC exporters, which is a substrate binding protein responsible for the capture and delivery of the substrate to be transported by the permeases in the membrane. This interaction is essential and fundamental for the velocity and specificity of the transport, aside the fact that it induces conformational changes in the whole system that allows it to work properly. Without the interaction of the binding protein, there is no transport. Based in this assumption and on the fact that ABC importação are present only in prokaryotic organisms, this project aims to define a model of inhibition of this systems based on antibodies production against different ABC transporters from the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in a way that blocks the interaction between the permeases and the substrate binding proteins. For this purpose, permease regions which are supposed to interact with the binding proteins were expressed utilizing the *RAD display* system and then used to produce antibodies against them. In this system, the interest sequences were extensively analyzed by bioinformatics and afterwards cloned inside the gene *radA* from *Pyrococcus furiosus*, being expressed as chimeric proteins, always exposed and soluble. The proteins now called "pRAD-loops" were then purified utilizing ion exchange chromatography and size exclusion chromatography and used for antibody production. Indirect ELISA assays were performed to determine the antibody titer in the serum of animals immunized with the Rad+loop proteins and afterward a series of assays including *western blotting*, *whole cell elisa* and immunofluorescence characterized the interaction between the antibodies with their respective ABC targets. Finally, it was performed an inhibition assay utilizing minimum media of growth on the presence of the IgGs. The results presented in this work are of great importance considering that it is the first the permeases are used as targets of ABCs inhibition, what is extremely relevant for the development of new strategies that aim blocking the action of these protein complexes vital for the cellular homeostasis and vastly disseminated among prokaryotes and eukaryotes.

Key words: ABC transporters. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Antibody mediated inhibition. Membrane protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - As classes de transportadores ABC.....	20
Figura 2 - Estrutura do transportador de maltose MalFGK ₂ de <i>E. coli</i> em contato com a SBP MalE	24
Figura 3 - Estrutura do transportador de Vitamina B12 BtuCD de <i>E. coli</i> em contato com a SBP BtuF	27
Figura 4 - Estrutura do transportador de Molibdato ModBC de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> em contato com a SBP ModA.	29
Figura 5 - Estrutura do exportador de drogas Sav1866 de <i>S. aureus</i>	35
Figura 6 - Análise de bioinformática para identificação dos <i>loops</i> de ModB de <i>E. coli</i>	49
Figura 7 - Representação da estrutura dos transportadores de maltose, molibdato e vitamina B12 de <i>E. coli</i> e seus respectivos <i>loops</i> expostos ao periplasma.....	50
Figura 8 - Relação dos operons e ORFs de todos os ABCs de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> utilizados como alvo no presente trabalho.	52
Figura 9 - Análise de bioinformática para identificação dos <i>loops</i> de ModB de <i>S. aureus</i>	52
Figura 10 - Análise de bioinformática para identificação dos <i>loops</i> de MalD de <i>S. aureus</i>	53
Figura 11 - Representação da estrutura das permeases ModB, MalD e o exportador Sav1866 de <i>S. aureus</i> e seus respectivos <i>loops</i> expostos ao periplasma.....	54
Figura 12 - Esquematização da clonagem independente de ligase (LIC) no vetor pRAD.....	56
Figura 13 - Testes de restrição.....	56
Figura 14 - SDS-PAGE dos testes de expressão das diferentes proteínas Rad+ <i>loops</i>	57
Figura 15 - Purificação das proteínas Rad + <i>loop</i> de <i>E. coli</i>	59
Figura 16 - Purificação das proteínas Rad + <i>loop</i> de <i>S. aureus</i>	60
Figura 17 - Gráficos plotados para o cálculo dos títulos dos diferentes soros obtidos por ELISA indireto.....	64

Figura 18 - Verificação do reconhecimento dos anticorpos anti-Rad + <i>loop</i> de <i>E. coli</i> por <i>Western Blot</i>	66
Figura 19 - Verificação do reconhecimento do anticorpo anti-Rad + MalD <i>loop</i> de <i>S. aureus</i> por <i>Western Blot</i>	66
Figura 20 - Ensaio funcional da atividade de anticorpos anti-Rad + <i>loops Whole Cell Elisa</i>	69
Figura 21 - Detecção da ineficiência do anticorpo anti-Rad MalG <i>loop</i> se ligar ao seu antígeno MalG de <i>E. coli</i> na ausência de etapas de permeabilização com saponina em imunofluorescência.....	71
Figura 22 - Detecção da eficiência do anticorpo anti-Rad MalD <i>loop</i> se ligar ao seu antígeno MalD de <i>S. aureus</i> na ausência de etapas de permeabilização com saponina em imunofluorescência.....	72
Figura 23 - Investigação da inibição de transportador de maltose de <i>S. aureus</i> mediada por anti-Rad MalD <i>loop</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise dos <i>loops</i> alvo quanto à sua sequência, pI e Massa molecular..	58
Tabela 2 - Concentração das proteínas após todas as etapas de purificação..	61
Tabela 3 - Título dos soros obtidos na sangria realizada após a quinta imunização dos animais.. ..	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – ATP Binding Cassette
ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Monofosfato de adenosina
ATP – Trifosfato de adenosina
CAP – Proteína ativadora de catabólito
Blast – Basic local alignment tool
bp – Par de base nitrogenada
BSA – Albumina de soro bovina
CFU – Unidade formadora de colônia
C-terminal – Carboxi-terminal
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
g – gravidade
IgG – Imunoglobulina
IPTG - Isopropil- β -D- tiogalactosídeo
Isd – Iron regulate surface determinant
kDa – Kilodaltons
KEGG – Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LB – Luria-Bertani
LIC – Clonagem independente de ligase
LT1 – Toxina termolábil de *E. coli*
M - Molar
MDR – Multiple drug resistance
MES – Ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico
mL – Mililitro
 μ g - Micrograma
 μ M – Micromolar
mg - Miligrama
mM – Milimolar
NBD – Nucleotide binding domain
ng – Nanograma

nm - Nanômetro
N-terminal – Amino-terminal
OD – Densidade óptica
OPD - Orto-fenil-diamina
PBS – Tampão fosfato salino
PDB – Protein data bank
PFA - Paraformaldeído
pH – Potencial hidrogeniônico
PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil
pI – Ponto isoelétrico protéico
Pi – Fosfato inorgânico
PVDF - Fluoreto de polivinildelina
RNA – Ácido ribonucléico
RNAt – Ácido ribonucléico transportador
rpm – Rotações por minuto
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SBP – Proteína ligadora de substrato
SEC – General secretion pathway
SEC - Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de Exclusão Molecular)
TAT – Twin arginine translocation pathway
TBS – Tampão tris salino
Tris – Hidroximetil-aminometano
TMD – Transmembrane domain
V – Volt
WCE – Whole cell ELISA
WHO – World Health Organization
Vitamina B12 – Cianocobalamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL	18
2.1 Transportadores ABC do tipo importadores	18
2.2 O papel dos transportadores ABC de maltose, vitamina B12 e molibdato na homeostase e virulência de <i>Escherichia coli</i>	22
2.3 Transportadores ABC do tipo importadores em <i>Staphylococcus aureus</i> ...	30
2.4 Exportadores ABC e a resistência á drogas	33
2.5 O sistema <i>RAD display</i>	35
2.6 A inibição de transportadores ABC.....	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Análises de bioinformática.....	48
5.2 Clonagem independente de Ligase (LIC)	54
5.3 Expressão e Purificação das proteínas Rad+ <i>loops</i>	57
5.4 Testes ELISA e obtenção do título de anticorpos nos soros	61
5.5 Detecção das permeases selvagens de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> por meio dos diferentes anticorpos anti-Rad + <i>loop</i> em <i>Western Blot</i>	65
5.6 Investigação da capacidade dos anticorpos reconhecerem seus alvos por Elisa de célula inteira (<i>Whole cell Elisa</i>)	67
5.7 Investigação da capacidade dos anticorpos reconhecerem seus alvos por Imunofluorescência	69
5.8 Avaliação do crescimento bacteriano em meio mínimo na presença de anticorpos anti-Rad <i>loop</i>	72
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO

Os transportadores ABC (Do inglês ATP Binding Cassette) estão entre um dos mais importantes grupos protéicos responsáveis por importar e exportar pela membrana plasmática de células procarióticas e eucarióticas uma grande variedade de solutos, contra um gradiente de concentração. O transporte ativo de substâncias requer uma fonte de energia livre para o funcionamento dos transportadores, e se tratando dos transportadores ABC, a energia é obtida por meio da hidrólise de ATP que ocorre no domínio intracelular. Acoplada ao domínio transmembrana do transportador, a energia fornecida pelo fosfato liberado é capaz de desencadear a mudança conformacional do domínio transmembrana, permitindo assim o transporte de soluto para o interior ou exterior da célula (OLDHAM; CHEN, 2011).

Por conta das diversas funções relacionadas aos transportadores na manutenção do metabolismo celular não é surpreendente que cerca de 4 a 5% do genoma de *Escherichia coli* codifique proteínas destes transportadores (LOCHER, 2004). Dessa forma, torna-se cada vez mais interessante o estudo dos mais diversos tipos de transportadores ABC e de eventos celulares relacionados aos mesmos como os fenômenos de virulência, patogenicidade e resistência á drogas mediada pelos mesmos. Transportadores do tipo importadores, presentes somente em procariotos, apresentam um componente adicional quando comparados com exportadores, que é a proteína ligadora de substrato, SBP (Substrate Binding Protein), estando a mesma difusa de forma livre no periplasma de células gram negativas e ancorada á membrana plasmática em gram positivas.

A SBP tem como função específica conferir afinidade e especificidade ao sistema de transporte, o qual é induzido somente após a interação desta com as permeases na membrana. Vários transportadores do tipo importadores têm sido relacionados como essenciais para o crescimento e infecção bacterianas de forma que se tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de inibidores

(GARMORY; TITBALL, 2004). No caso de exportadores, o fenômeno de resistência múltipla a drogas (MDR, do inglês Multiple Drug Resistance) é intimamente ligado aos mesmos que funcionam como bombas de efluxo de antibióticos e outras drogas, tanto em procariotos como em eucariotos (LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007).

Uma forma de bloqueio ou inativação destes transportadores pode atenuar o crescimento bacteriano ou até reverter os efeitos da resistência à antibióticos ou drogas. Adicionalmente, dado que os domínios transmembrana são os que apresentam maior diversidade entre ortólogos, é possível que, se usados como alvo, a inibição seja feita de forma específica, com alvos direcionados para um ou poucos tipos de transportadores.

Este trabalho propõe o desenvolvimento de uma estratégia de bloqueio de transportadores ABC utilizando anticorpos cujos epítomos sejam as regiões das permeases expostas ao ambiente periplasmático ou extracelular. Desta forma, ao se ligarem às regiões alvo explicitamente formadoras do poro de passagem, os anticorpos seriam capazes de bloquear a saída ou entrada de moléculas. Para contornar o problema da expressão de proteínas de membrana, e devido à alta solubilidade e facilidade para a purificação, escolhemos a técnica *RAD Display* para a produção de proteínas quiméricas compostas por fragmentos das permeases de interesse em associação à proteína RadA, uma recombinase de *Pyrococcus furiosus* que apresenta alta estabilidade térmica (LAU et al., 2014; ROSSMANN et al., 2017). A metodologia de clonagem no sistema *RAD Display* é baseada no protocolo independente de ligase LIC, (Ligase Independent Cloning) (ASLANIDIS; DE JONG, 1990), o que gera resultados mais rápidos e menos onerosos.

Como alvo, escolhemos transportadores de duas bactérias com envoltório diferenciado: primeiramente a bactéria *E. coli*, gram negativa, pela facilidade de crescimento e utilização para expressão de proteínas heterólogas, bem como por ser a espécie que têm o maior número de componentes de transportadores com estrutura

resolvida e estudados funcionalmente. Dentre os ABCs presentes em *E. coli*, escolhemos os complexos importadores relacionados ao transporte de maltose (KHARE et al., 2009), molibdato (GERBER et al., 2008) e vitamina B12 (HVORUP et al., 2007). Também foi usada como alvo a gram positiva *Staphylococcus aureus* por ser um problema central na resistência à antibióticos e disseminação de infecções nosocomiais em todo o mundo, além de ser a portadora do exportador Sav1866, um complexo intimamente relacionado à MDR que já teve sua estrutura resolvida (DAWSON; LOCHER, 2007; OTTO; GÖTZ, 2001). Espera-se o bloqueio estérico das regiões das permeases da membrana, que são expostas à região externa impedindo a ligação da proteína periplasmática no caso de importadores, e impedindo o efluxo de drogas no caso de exportadores, bloqueando o transporte como um todo.

A inativação de transportadores ABC por meio de anticorpos contra a SBP é amplamente utilizada (TANAKA et al., 2018) e já foi recentemente reportada pelo nosso grupo, mostrando resultados promissores (FERREIRA et al., 2016). Contudo, na abordagem atual temos como alvo as permeases, de forma que o sucesso obtido neste trabalho poderia abrir a perspectiva de utilização para o bloqueio de transportadores do tipo exportador também, além de abrir margem para o desenvolvimento de metodologias alternativas de alta eficiência na inibição de ABCs.

2. SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

2.1 Transportadores ABC do tipo importadores

Os transportadores ABC formam uma das mais estudadas e caracterizadas famílias protéicas presentes nos três reinos da vida, sendo os principais responsáveis pelo transporte ativo de solutos pela membrana plasmática para o meio intracelular (CHEN et al., 2001). Os ABCs não são responsáveis somente pela importação de nutrientes, mas também pelo transporte entre organelas no caso de

eucariotos, secreção no caso de exportadores e apresentação de peptídeos em se tratando de células do sistema imune. O transporte ativo se caracteriza pela passagem de diferentes substratos contra um gradiente de concentração pela membrana celular graças á uma fonte de energia que fornece condições termodinâmicas favoráveis para a mudança conformacional do transportador (OLDHAM; CHEN, 2011). Em *E. coli*, cerca de 5% de todo o genoma está relacionado a produção de proteínas relacionadas ao transporte de solutos necessários á célula (LOCHER, 2004) comprovando assim a importância dessa categoria de proteínas para a manutenção da homeostase dos organismos sendo eles procarióticos ou eucarióticos.

No caso de importadores ABC, os mesmos podem ser divididos em três tipos distintos. Os tipos 1 e 2 contém ambos uma proteína ligadora de substrato SBP e podem ser diferenciados entre si quanto ao número de hélices transmembrana de suas permeases e ao processo global de importação. O tipo 3, uma classe especial de importadores, contém dois domínios transmembrana e ausência de SBP. um desses domínios se denomina componente S e desempenha papel semelhante ás proteínas ligadoras de substrato nos tipos 1 e 2 (TER BEEK; GUSKOV; SLOTBOOM, 2014). Um esquema dos tipos de ABCs é retratado na Figura 1.

Como apontado anteriormente, se tratando dos importadores ABC de tipo 1 e 2 denominados clássicos, ambos contém além das proteínas pertencentes ao complexo presente na membrana interna, uma proteína adicional chamada de proteína ligadora de substrato SBP, sendo a proteína ligadora de L-arabinose de *E. coli* a primeira proteína dessa categoria a ter sua estrutura resolvida (PHILLIPS et al., 1976). No caso de transportadores de tipo 1, a SBP está presente em excesso em relação ao transportador, ao passo que em transportadores de tipo 2 está presente em quantidades estequiométricas no periplasma (TANAKA et al., 2018)

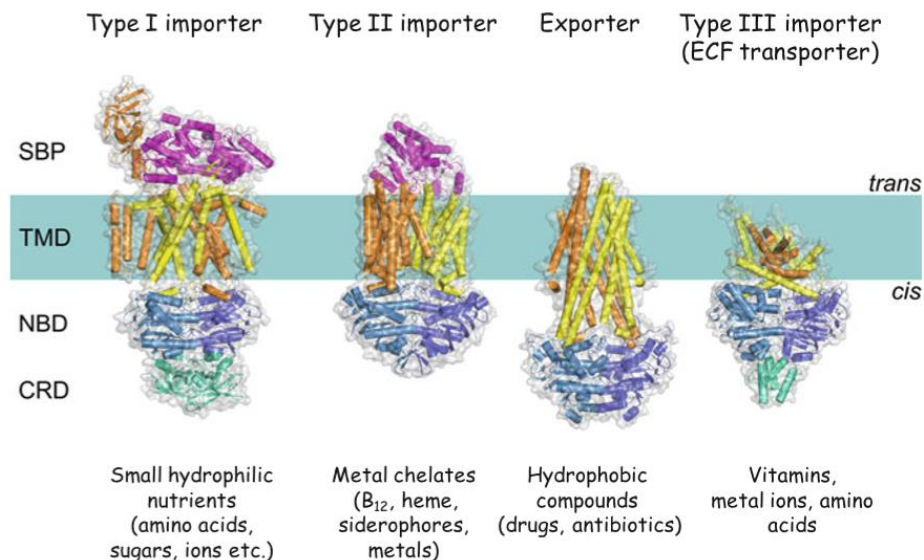


Figura 1 - As classes de transportadores ABC. Duas das classes compreendem os importadores clássicos com a presença da proteína ligadora de substrato (SBP) 1 e 2; os ECFs (tipo 3); um exportador ABC também é retratado. (Imagem retirada de TER BEEK et al., 2014).

As proteínas ligadoras de nucleotídeo (Nucleotide Binding Domains NBDs) estão presentes na porção citoplasmática do transportador e constituem os domínios mais conservados dos mesmos. São formadas de dois subdomínios, um grande domínio globular em que está presente o *P-loop* (que contém o motivo denominados *Walker-A*) e o motivo *Walker-B*, além de um subdomínio que contém o motivo LSGGQ, a chamada assinatura sequencial dos transportadores ABC. Os dois domínios por sua vez são ligados por uma região chamada de *loop Q*, que contém um resíduo de glutamina altamente conservado. A dimerização dos NBDs permite o acoplamento de moléculas de ATP entre o *P-loop* (motivo *Walker-A*) de um domínio e o motivo LSGGQ do outro. O *loop Q* por sua vez é a região responsável pela interação com as permeases, proteínas transmembrana do transportador (DAVIDSON et al., 2008).

As permeases por sua vez, contém na interface citoplasmática com os NBDs o motivo EAA, primeiramente descrito no transportador de maltose MalFGK₂ (OLDHAM et al., 2007), na região responsável pelo acoplamento com as ATPases, também chamadas por esse motivo de *coupling helixes* (HVORUP et al., 2007). Uma organização semelhante do motivo EAA pode ser

encontrada no transportador de vitamina B12 BtuCD (DAVIDSON, 2002) e no transportador de Molibdato ModBC (HOLLENSTEIN; FREI; LOCHER, 2007).

A clivagem de ATP nos NBDs transmite uma mudança conformacional às permeases, mudança essa que culminará com a internalização do substrato por mecanismos que diferem em transportadores de tipo 1 e 2 (LOCHER, 2004). Ao contrário dos NBDs, as permeases apresentam pouca conservação em sua estrutura primária entre espécies distintas, provavelmente devido aos mais variados solutos que transportam. As substâncias que atravessam em direção ao exterior ou interior da célula deverão em algum ponto interagir com o domínio TMD (Transmembrane Domain) composto pelo dímero de permeases, a fim de desencadear os eventos estruturais que culminarão com a hidrólise de ATP no NBD e mudança conformacional de TMD que possibilitarão sua passagem (KHARE et al., 2009).

A ligação do substrato preso no bolsão da SBP ao domínio TMD ocorre nas regiões expostas da permease voltadas para o exterior, e têm como papel induzir as mudanças conformacionais que desencadearão o transporte mediado pela hidrólise de ATP (LOCHER, 2004). Já foi inclusive demonstrado que a SBP estimula a hidrólise de ATP nos NBDs por estabilizar o estado catalítico dos mesmos (CHEN et al., 2001; A. L. DAVIDSON; SHUMAN; NIKAIDO, 1992; LIU; LIU; AMES, 1997).

Estudos em proteolipossomos mostram ainda que a adição da SBP estimula a atividade do transportador, mesmo que o mesmo apresente uma atividade basal reportada (BORTHS et al., 2005). Sendo os *loops* expostos ao meio extracelular das permeases de importadores responsáveis pela ligação das SBPs de papel vital no processo, estes se tornam alvos interessantes de inibição quando se tem como finalidade inativar o transportador ABC.

2.2 O papel dos transportadores ABC de maltose, vitamina B12 e molibdato na homeostase e virulência de *Escherichia coli*.

Para que pudéssemos avaliar se a inibição de um transportador era eficiente, utilizamos inicialmente como alvos três transportadores conhecidamente relevantes no metabolismo de *E. coli*. Estes transportadores além de estarem envolvidos com o transporte de moléculas essenciais, possuem estruturas tri-dimensionais resolvidas. Esse fato foi importante para a identificação dos *loops* de interação entre os TMDs e as SBPs.

Maltose (4-O- α -D-Glicopiranosil-D-glicose) é um dissacarídeo redutor composto de duas moléculas de glicose unidas por uma ligação glicosídica. O sistema de captação de maltose é responsável pela importação de polímeros de glicose (maltodextrinas) com até 8 moléculas de glicose unidas, sendo os genes responsáveis pela importação e metabolismo de maltose componentes do regulon *mal*, controlado pela proteína reguladora MalT (BOOS; SHUMAN, 1998).

Cinco genes desse regulon são responsáveis pela transcrição de proteínas relacionadas ao transporte de maltodextrinas. LamB, uma maltoporina presente na membrana externa, é responsável pela difusão de diferentes açúcares para o periplasma; MalE, a SBP, é responsável pela especificidade do sistema e captação de maltose no periplasma; e finalmente as proteínas formadoras do transportador ABC, sendo MalF e MalG as permeases embebidas na membrana plasmática, e por fim MalK, o NBD, presente em forma de dímero na porção citoplasmática do transportador (DIPPEL; BOOS, 2005; RAIBAUD; RICHET, 1987).

Por se tratar de um açúcar que não a glicose, os genes do regulon *mal* responsáveis pela importação e metabolismo de maltose, incluindo o operon *malEFG*, sofrem influência direta da repressão catabólica. Os níveis de glicose intracelular medeiam a fosforilação da enzima III^{Glc}, que encontrando-se fosforilada irá funcionar como um inibidor alostérico da enzima adenilato ciclase, responsável pela síntese de AMP cíclico cAMP. Estando AMP cíclico ausente, este não poderá se ligar a enzima CAP, que por sua vez não se ligará aos promotores de genes como por exemplo *malT*, o principal regulador positivo do regulon *mal* (CHAPON;

KOLB, 1983).

De forma semelhante, níveis baixos de glicose intracelular irão resultar em III^{Glc} desfosforilada, Adenilato ciclase estará ativa e cAMP presente para se ligar á CAP, *malT* poderá dessa forma ser plenamente exposto e por sua vez mediar a transcrição do restante do regulon *mal* (CHAPON; KOLB, 1983; DEAN, et al., 1990). O promotor do próprio operon *malEFG* é regulado por CAP-cAMP, o que mostra a intensa influência da repressão catabólica sobre os genes responsáveis pelo transportador ABC de maltose (BOOS; SHUMAN, 1998).

A repressão catabólica também tem ação direta especificamente com o transportador ABC já traduzido e funcional. A região C-terminal da ATPase MalK pode interagir com III^{Glc}, e estando esta fosforilada, ou seja na presença de glicose intracelular, pode se ligar a MalK oque bloqueia a clivagem de ATP. Dessa forma, o transportador é estabilizado na sua forma voltada para o citoplasma, e conseqüentemente cessa a importação de maltose para o interior da célula (BÖHM et al., 2002; CHEN, 2013).

Se tratando especificamente do transportador ABC, este é um dos mais bem caracterizados transportadores da literatura, tanto estrutural como funcionalmente (OLDHAM et al., 2007). O reconhecimento do substrato do sistema no periplasma após a internalização pela maltoporina LamB se dá pela SBP MalE, que apresenta alta afinidade por maltose e outras maltodextrinas, além de estar em excesso quando comparada ás permeases e ATPases do sistema. Se tratando de uma SBP, MalE consiste de dois domínios em lóbulos ligados por uma estrutura de dobradiça, sendo que cada um desses domínios interage com uma das permeases embebidas na membrana (DEAN et al., 1992).

As permeases do transportador de maltose se apresentam como um heterodímero. MalF (57,0 kDa), consiste de oito α -hélices atravessando a membrana interna formando três *loops* periplasmáticos e três *loops* citoplasmáticos, ambos C e N-terminais da proteína se encontram no citoplasma (Figura 2). MalG (23,2 kDa) se organiza similarmente compreendendo seis α -hélices transmembrana formando três *loops* periplasmáticos e dois citoplasmáticos, e assim como MalF

têm suas regiões C e N-terminais no citoplasma. Entre as hélices transmembrana 6 e 7 (MalF) e 4 e 5 (MalG) estão os *loops* citoplasmáticos que contêm o motivo EAA, responsável pela interação com as respectivas ATPases MalK (DAUS; GROTE; SCHNEIDER, 2009; KUHNAU et al., 1991; OLDHAM; CHEN, 2011).

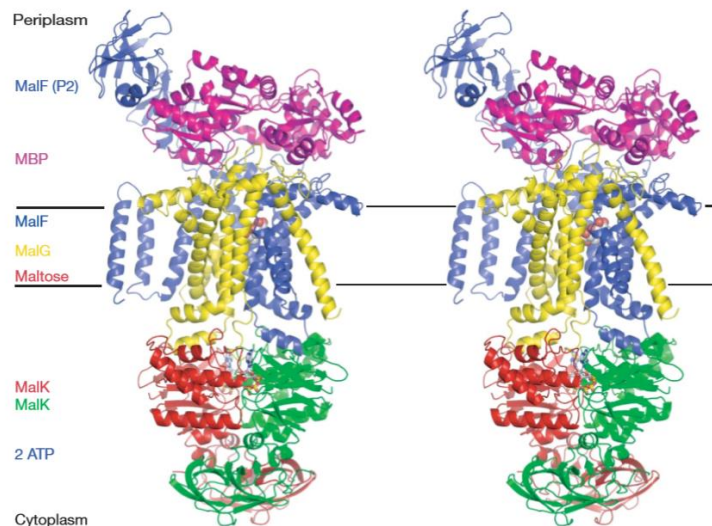


Figura 2 - Estrutura do transportador ABC de maltose MalFGK₂ de *E. coli* em contato com a SBP MalE. Em representação do tipo cartoon são apresentados os domínios periplasmático MalE (Roxo), heterodímero das permeases MalF e MalG (azul e amarelo, respectivamente) e homodímero da ATPase MalK (verde e vermelho). Imagem retirada de OLDHAM et al., 2007.

Os *loops* periplasmáticos das permeases realizam extensivas interações com a SBP MalE na estrutura depositada por Oldham e colaboradores (2007) (PDB: 2R6G). Duas interações notáveis são a inserção do *loop* periplasmático 3 de MalG (Leu 236 – Phe 263) no sítio de ligação ao açúcar da SBP, que hipoteticamente garante um transporte eficiente por deslocar o açúcar do bolsão de MalE o tornando livre para se mover em direção ao transportador, e o contato do *loop* periplasmático 2 de MalF (Phe 91 – Phe 277) com uma grande porção do N terminal da SBP. O volume exacerbado adotado pelo *loop* 2 de MalF é uma excessão entre as estruturas clássicas de importadores ABC e possivelmente tem função de auxiliar a ligação da SBP ao sistema (DIPPEL; BOOS, 2005).

A interação da SBP com as permeases estimula a hidrólise de ATP nos NBDs (AUSTERMUHLER et al., 2004) e induz mudanças conformacionais nessas proteínas, principalmente em uma das hélices transmembrana que apresenta uma extensão no citoplasma, se encontrando em contato direto com os NBDs de forma a estimular a

hidrólise de ATP. A quebra de ATP em ADP + Pi irá orquestrar toda a mudança conformacional das permesases permitindo o transporte (DAVIDSON et al., 2008).

Já existem na literatura relatos da importância da maltose para o sucesso da colonização intestinal por *E. coli* (CHANG et al., 2004). A cepa MG1655 de *E. coli* comensal quando carregando nocaute no gene *malP* mostra declínio do número de unidades formadoras de colônia (CFUs) nas fezes contabilizadas após ingestão bacteriana em camundogos CD-1. O mesmo trabalho demonstra ainda que a cepa EDL933 de *E. coli* patogênica com deleção em todo o operon *malEFG* responsável pelo transportador ABC apresenta uma drástica diminuição do número de CFUs fecais quando comparada à cepa selvagem, o que aponta a importância da importação desse açúcar na colonização. É relatado dessa forma a importação e catabolismo da maltose como vantagens competitivas importantes *in vivo*, e mudanças que afetem a disponibilidade desse substrato podem afetar diretamente a colonização intestinal (JONES et al., 2008).

Metais como zinco, cobalto, ferro e molibdênio estão presentes em todos os organismos devido à sua necessidade em diversos processos biológicos realizados pelas células, podendo-se citar principalmente a sua ação como cofatores enzimáticos. Estima-se que entre 30 e 40% de todas as enzimas conhecidas sejam metaloproteínas, evidenciando a tamanha importância de metais para a homeostase celular (PORCHERON et al., 2013).

Para combater infecções, uma das primeiras medidas tomadas pelo sistema imune inato é a ativação da imunidade nutricional, caracterizada pelo sequestro de metais de transição impedindo assim que esses sejam assimilados pelo patógeno. Portanto, bactérias devem possuir uma maquinaria sofisticada para a importação dessas moléculas e dessa forma possibilitar sua sobrevivência em ambientes em que esses micronutrientes se encontrem escassos (KLEIN; LEWINSON, 2011).

Transportadores ABC estão associados ao transporte de metais de transição geralmente ligados à moléculas orgânicas chamadas

quelantes, como por exemplo a vitamina B12 (cianocobalamina), que tem como íon central o cobalto. Essa vitamina e seus derivados são importantes em diversas reações da maquinaria de *E. coli* (KLEIN; LEWINSON, 2011).

Metilcobalamina, obtida a partir da mesma, funciona como cofator enzimático da enzima MatH, que cataliza o estágio final da síntese do aminoácido metionina (LUNDRIGAN; KADNER, 1989); Adenosilcobalamina por sua vez é cofator enzimático da etanolamina-amônia liase, responsável pela primeira reação de catabolismo de etanolamina como fonte nutricional de nitrogênio e carbono (JONES; TURNER, 1971). A cobalamina está ainda envolvida na síntese da base modificada Queuosina (Q), presente no anticodon dos RNAs transportadores de Asparagina, Histidina, Tirosina e Ácido aspártico em *E. coli* (FREY et al., 1988).

A importação de cobalamina para dentro da célula de *E. coli* se inicia pela ligação da mesma ao receptor TonB da membrana externa BtuB, e estando presente no periplasma poderá por sua vez se ligar a SBP BtuF, que irá se ancorar no transportador ABC BtuCD. BtuC é o monômero das permeases e BtuD o NBD que energizará o sistema. O transportador ABC nesse caso é transcrito pelo operon *btuCED* em *E. coli*, e já existem na literatura relatos de que inserções feitas por transposons nos genes componentes desse operon resultam em impedimento de transporte de cobalamina e acúmulo da mesma no espaço periplasmático (FRIEDRICH; DEVEAUX; KADNER, 1986; RIOUX; KADNER, 1989).

O transportador BtuCD (Figura 3) se categoriza como um transportador de tipo 2 (DAVIDSON et al., 2008). A SBP BtuF que captura vitamina B12 no periplasma tem estrutura clássica composta com dois lóbulos unidos, os quais formam um bolsão que aprisiona o ligante (KORKHOV; MIREKU; LOCHER, 2012). Sua permease BtuC (34.9 kDa) é uma proteína que contém 10 hélices transmembrana, além extensas regiões no periplasma que irão realizar interações com a BtuF de forma que cada lóbulo da SBP interage de maneira assimétrica com cada uma das permeases, que se organizam em homodímero (BORTHS

et al., 2002; HVORUP et al., 2007).

Um resíduo predito como de grande importância na docagem da SBP por Hvorup e colaboradores (2007) após a obtenção da estrutura de BtuCD ligado à BtuF (PDB: 2QI9) é a Arginina 56, que realiza pontes salina com os resíduos de Glutamato 74 e 202 em cada um dos lóbulos de BtuF. O *loop* periplasmático presente após a hélice transmembrana 5 e incluindo parte da hélice 5 α de ambos os monômeros de BtuF (Phe 168 – Met 183) ocupa a região da SBP que estaria envolvida a ligação com a vitamina B12 nessa mesma estrutura depositada, sendo possivelmente responsável pelo deslocamento do ligante do bolsão da SBP para dentro do transportador, de forma semelhante ao *loop* 2 de MalG no transportador de maltose MalFGK₂ (OLDHAM et al., 2007).

Por fim, os domínios NBDs formados pela dimerização de BtuD contém motivos conservados de transportadores ABC como a assinatura LSGGQ e o *loop*-P (Walker-A), sendo esses responsáveis pela clivagem de ATP que culminará com a internalização de vitamina B12 para o citoplasma (BORTHS et al., 2005).

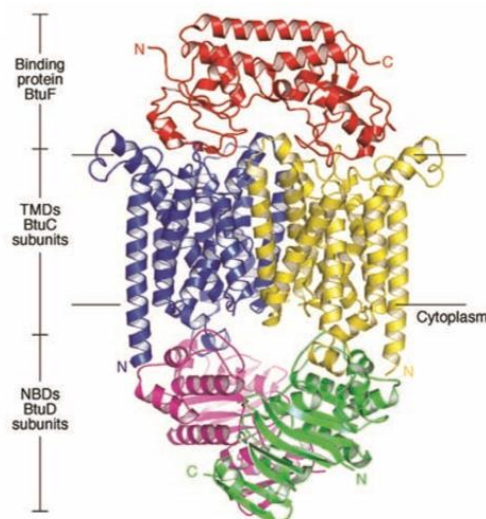


Figura 3 - Estrutura do transportador de Vitamina B12 BtuCD de *E. coli* em contato com a SBP BtuF. A proteína periplasmática é mostrada em cartoon vermelho, as permeases BtuC em amarelo e azul e as ATPases BtuD em verde e rosa. Imagem retirada de HVORUP et al., 2007.

Assim como a Maltose e a Vitamina B12, o molibdênio é um metal de transição importante para a homeostase celular e é encontrado no meio ambiente sobretudo na forma do oxiânion molibdato de sódio (MoO₄²⁻). A célula necessita de níveis baixos de molibdato para sua

manutenção, o qual atua como cofator enzimático em vias metabólicas chave tanto em microrganismos como plantas e animais superiores. Com relação à sua interação com enzimas, o molibdênio se encontra presente em cofatores associado a ferro ou à pterina, sendo essa última a forma a mais predominante (DELGADO et al., 2006; WOOTTON et al., 1991).

A principal função de enzimas que se associam ao cofator de molibdato está associada ao metabolismo energético anaeróbio, sobretudo no fim da cadeia transportadora de elétrons em que são reduzidos aceptores de elétrons que não o oxigênio. Redutases associadas à membrana que têm como substratos o nitrato, dimetilsulfóxido (DMSO) e óxido de trimetilamina só funcionam na presença do cofator de molibdato-pterina. No caso de nitrato redutase, quando esta se encontra solúvel funcionando na conversão de nitrato em nitrito, é elucidada a importância do molibdato para a fixação de Nitrogênio (WOOTTON et al., 1991). Ainda nesse contexto, a oxidação de xantina e hipoxantina em ácido úrico, estágio inicial na assimilação de nitrogênio, é realizada por uma enzima acoplada ao cofator de molibdato-pterina. A enzima formato desidrogenase, importante no metabolismo energético e para assimilação de carbonos, também só realiza a catálise quando associada ao esse mesmo cofator (GRUNDEN et al., 1996; WOOTTON et al., 1991).

A importação de molibdato em bactérias gram negativas começa na membrana externa, onde o mesmo é rapidamente internalizado para o periplasma sendo suposto que uma porina de baixa especificidade realize essa primeira etapa (LOPEZ; BASTIDAS; DUBOURDIEU, 1993). O transporte para o citoplasma através da membrana interna porém é realizado pelo transportador ABC ModBC, transcrito pelo operon *modABCD* (GRUNDEN et al., 1996; MAUPIN-FURLOW et al., 1995).

Mutações em genes do operon *modABCD* geram um fenótipo deficiente na eficiência de nitrato redutase e formato desidrogenase, o que evidencia a importância indireta do transportador ABC no metabolismo bacteriano. Estudos envolvendo ainda mutações em *modABCD* mostram que além de adentrar a célula por meio do

transportador ModBC, molibdato pode também se utilizar do transportador de sulfato CysPWUA (LINDBLOW-KULL; KULL; SHRIFT, 1985) e com baixa afinidade por um terceiro transportador inespecífico (LEE; WENDT; SHANMUGAM, 1990).

O transportador de molibdato ModBC de *Archaeoglobus fulgidus*, uma archaea hipertermófila metabolizadora de sulfato (BIRKELAND et al., 2017), teve sua estrutura resolvida em associação com a SBP ModA por Hollestein e colaboradores (2007) (PDB: 2ONK), como mostrado na Figura 4.

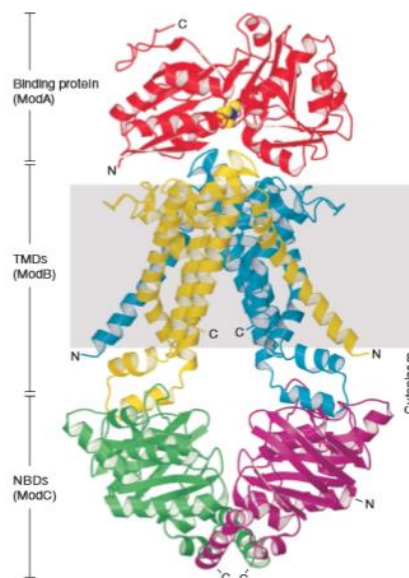


Figura 4 - Estrutura do transportador de Molibdato ModBC de *Archaeoglobus fulgidus* em contato com a SBP ModA. Em vermelho a periplasmática ModA, em azul e amarelo os monômeros de ModB, e em roxo e verde os monômeros de ModC (NBDs). Imagem retirada de HOLLESTEIN; FREI; LOCHER, 2007.

A SBP ModA é composta por dois lóbulos, ambos dos quais interagem com a permease ModB por meio de resíduos carregados. O bolsão ligador de substrato da SBP se encontra orientado em direção às permeases, de tal forma que o molibdato possa adentrar o canal transmembrana. As permeases ModB de *A. fulgidus* (27,8 kDa) contém 6 domínios transmembrana cada, totalizando 12 regiões transmembrana para o transportador completo. Os *loops* periplasmáticos mais proeminentes e que interagem com ModA se encontram entre as hélices transmembrana 3 e 4 (Phe 133 – Gly 153) e 5 e 6 (Ile 240 – Met 253) respectivamente, e por interagirem com lóbulos distintos da SBP, a

conformação dos *loops* não segue a simetria encontrada no transportador (HOLLENSTEIN; FREI; LOCHER, 2007).

Por fim, o dímero de ModC compõe o NBD do ABC, contendo em sua estrutura os motivos clássicos *walker A/loop-P* e o motivo assinatura LSGGQ envolvidos no acoplamento e lise do ATP. Por meio das hélices de acoplamento presente em ModB, contendo o motivo EAA, será realizada a mudança conformacional das permeases e passagem de molibdato para o citoplasma (GERBER et al., 2008).

2.3 Transportadores ABC do tipo importadores em *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o mais importante patógeno envolvido em doenças nosocomiais descrito atualmente (OTTO; GÖTZ, 2001). Se trata de uma bactéria gram positiva que coloniza assintomaticamente as camadas exteriores da pele de ao menos um terço da população mundial e que, frente a uma ruptura da barreira celular, pode infectar o corpo sistematicamente (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997). O tratamento contra infecções causadas por *S. aureus* é um sério problema enfrentado pela WHO (World Health Organization) devido a sua crescente resistência á antibióticos, podendo-se citar como mecanismos de resistência a formação de uma camada extracelular que representa uma barreira física para a penetração dos mesmos para dentro da célula (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999) e a presença de plasmídeos que conferem resistência (OTTO; GÖTZ, 2001) seja pela produção de enzimas que clivem os fármacos ou por transcreverem bombas de efluxo, estando exportadores ABC presentes nessa categoria como descrito posteriormente.

Apesar de importadores ABC terem sido primeiramente descritos em bactérias gram negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa*, esses sistemas são igualmente importantes para a manutenção da homeostase em bactérias gram positivas como *S. aureus*. A maior diferença entre os importadores dos dois grupos bacterianos é a SBP, que diferentemente do reportado para organismos gram negativos em

que esse domínio se encontra livre no periplasma, em gram positivos a SBP fica ancorada na membrana plasmática. A SBP desses organismos portanto, age não só como uma carreadora de substrato, mas também como um *plug* que impossibilita que o mesmo retorne para o exterior do transportador (VAN DER HEIDE; POOLMAN, 2002).

Estudos de gram positivas como *Mycoplasma hyorhinis* e *Streptococcus pneumoniae* mostram que a SBP desses organismos se ancora à membrana por meio de um resíduo de Cisteína em sua porção N-terminal, que é glicerada após a passagem da proteína para o exterior da célula por meio das vias de secreção TAT ou SEC (TAM; SAIER, 1993). Após a clivagem do peptídeo sinal no motivo conhecido como *lipobox* [Leu/Val/Ile/Ala/Ser/Thr/Gly/Gly/Ala/Cys] , que ocorre entre os resíduos de Glicina ou Alalina e o resíduo de Cisteína, a SBP está pronta para ser lipidada, o que culminará com o ancoramento da proteína na região adjacente ao poro das permeases do transportador ABC correspondente (GRAF et al., 2018).

A importância de importadores ABC em *S. aureus* também já foi relacionada à imunidade nutricional. O importador MntABC é responsável pela importação de manganês, um importante metal que contribui para a resistência frente a diversas defesas do hospedeiro. Já foi demonstrado que MntABC não funcional torna a bactéria mais susceptível ao estresse oxidativo e diminui a competitividade desse patógeno no sítio de infecção com outros organismos (RADIN et al., 2018).

Dentre outros importadores já descritos, pode-se citar CntABCDF, o principal importador de zinco em *S. aureus* que também é capaz de importar cobalto e níquel (GRIM et al., 2017). PstSAB, o importador de fosfato inorgânico desse organismo já foi descrito como um transportador de alta importância na imunidade nutricional (KELLIHER et al., 2018). No trabalho descrito por Coulter e colaboradores (1998), os transportadores ABC de peptídeos Opp1 e Opp2 se mostraram como elementos-chaves para a regulação do crescimento de *S. aureus*, além de influenciarem na susceptibilidade da bactéria contra o sistema imune inato. Em outro estudo realizado por meio de *screening* de mutantes

obtidos por transposons que apresentaram fenótipo avirulento em modelo murino, identificaram-se as permeases de um importador de oligopeptídeos de *S. aureus* OppD e OppF, sendo as mesmas importantes não só pela importação nutricional, mas também processamento de proteínas secretadas e até aderência celular (MEI et al., 1997)

O sistema de importação de ferro nesse patógeno é composto por nove proteínas Isd (Iron-regulated surface determinants), envolvidas principalmente no importação do grupo heme. Entre essas proteínas está um transportador ABC composto pela SBP IsdE e o dímero de permeases IsdF, entretanto a ATPase não é descrita (SHELDON; HEINRICHS, 2015). O transportador ModABC de *S. carnosus* foi o primeiro ABC responsável pela importação de molibdato descrito para uma gram positiva, sendo composto pela SBP ancorada á membrana plasmática ModA, a permease ModB e a ATPase ModC. A inserção de transposons no operon responsável pela transcrição desse transportador resultou em defeitos na redução de nitrato desse organismo (NEUBAUER; PANTEL, 1999), já que o molibdato atua principalmente como cofator de nitrato redutases como descrito em bactérias gram negativas (WOOTTON et al., 1991). Burke e Lascelles (1975) demonstraram experimentalmente a importância do molidato para a manutenção de nitrato redutases de *S. aureus* e sua influência na manutenção do seu metabolismo energético.

A importação de matoltodextrinas como maltose é pouco de descrita em *S. aureus*. Sabe-se que este dissacarídeo é hidrolizado em glicose e posteriormente fosforilado para entrar a via glicolítica (BUTTON et al., 1973), porém a molécula de glicose resultante também pode ser usada na via das pentoses e no ciclo de Krebs (LIEBEKE et al., 2011).

2.4 Exportadores ABC e a resistência á drogas

As bombas de efluxo, que expulsam drogas para fora do ambiente intracelular e cujos genes responsáveis podem se encontrar em plasmídeos específicos ou ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano, constituem um dos grandes responsáveis pela MDR (Multiple Drug Resistance) (LEPRI et al., 2016). Já existem vários desses sistemas descritos na literatura para diferentes organismos como EmrE em *E. coli* (LOMOVSKAYA; LEWIS, 1992) e o sistema QacA em *S. aureus* (TENNENT et al., 1989). Apesar de sua diversidade, todos os sistemas de exportação podem ser agrupados em dois grupos classificados de acordo com o sistema de energização: transportadores ABC que utilizam ATP, e transportadores secundários que podem utilizar no processo de expulsão da droga o antiporte de íons como H⁺ ou Na⁺ (LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007).

O primeiro exportador ABC descrito em bactérias foi o sistema LmrA de *Lactobacillus lactis*, que proporcionou um modelo do mecanismo pelo qual a droga é expulsa para fora da célula. O seu ciclo de transporte consiste inicialmente na ligação de ATP ao NDB e posterior ligação da droga no sítio de ligação da mesma na conformação voltada para o citoplasma. Em seguida, ocorre clivagem do ATP em ADP + Pi que culmina na transição para a conformação voltada para o exterior celular, por meio da qual a droga deixa o sistema (VAN VEEN et al., 2000).

Em *S. aureus*, já identificou-se que o plasmídeo carreador do gene *vgaB* é responsável pela transcrição de uma ATPase orfã de um exportador ABC responsável pela resistência a estreptogamina, um antibiótico que se liga à subunidade 50S ribossomal interferindo com a tradução proteica. A permease desse transportador provavelmente é encontrada no cromossomo mas seu *locus* exato ainda não foi elucidado (ALLIGNET; SOLH, 1997; OTTO; GÖTZ, 2001). Algumas bombas de efluxo secundárias também já foram descritas em *S. aureus* por conferirem vantagens adaptativas ao patógeno durante a infecção como NorA, NorB, NorD e Tet38. O desenvolvimento de inibidores para esses

transportadores, assim como para exportadores do tipo ABC portanto é de grande importância atualmente (LEPRI et al., 2016) .

O exportador ABC de *S. aureus* Sav1866 teve sua estrutura resolvida de forma funcional em solução detergente, demonstrando experimentalmente sua atividade dependente de ATP estimulada pela presença de drogas no meio (DAWSON; LOCHER, 2006). Esse exportador é composto por um NBD na região C-terminal (Leu³⁵⁷ - Leu⁵⁷⁸) clássico de ABCs contendo os motivos *Walker-A*, *Walker-B*, e *loop-Q* bem caracterizados. Adicionalmente foi identificada uma região chamada de *loop-X*, ausente em importadores, localizada próxima à assinatura ABC LSGGQ. Essa região teria possível envolvimento na transmissão da mudança estrutural no domínio transmembrana mediada pela clivagem de ATP no NBD (DAWSON; LOCHER, 2007).

O domínio N-terminal formado pelos primeiros 356 resíduos é composto por seis α -hélices transmembranares que se conectam por longos *loops* intracelulares entre as hélices 2 e 3 e 4 e 5, e curtos *loops* extracelulares interligando as hélices 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6. A estrutura depositada por Dawson e Locher (2006) mostra o exportador na conformação voltada para fora da célula (*outward*) quando cristalizado na presença de ADP, o que sugere que a clivagem de ATP pelo NDB, de fato fornece a energia para a sua mudança conformacional para a forma voltada para fora, assim como descrito para o exportador LmrA de *L. lactis* (VAN VEEN et al., 2000). A posterior resolução da estrutura também na conformação *outward* na presença de AMP, que não pode ser clivado, corrobora esse mecanismo de ação para Sav1866 e permite extrapolar que o mesmo processo é possivelmente adotado por outros exportadores ABC, inclusive eucarióticos (DAWSON; LOCHER, 2007). A Figura 5 mostra a estrutura de Sav1866 como descrito em Dawson e Locher (2006).

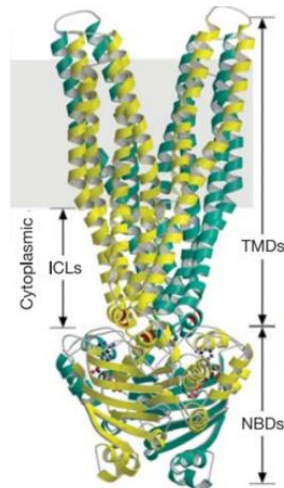


Figura 5 - Estrutura do exportador de drogas Sav1866 de *S. aureus*. Verde e amarelo mostram os dois monômeros formadores do transportador ativo. Nesse caso, um único gene codifica permease e ATPase que formam um homodímero. Imagem retirada de DAWSON; LOCHER, 2006.

Estudos funcionais com o transportador Sav1866 ainda estão longe de serem conclusivos quanto à identificação de que drogas são exportadas se usando do mesmo. Em um estudo em *L. lactis* nocauteada em *ImrA* e *ImrCD* e expressando heterologicamente Sav1866, é demonstrado estímulo da atividade ATPase do NBD do transportador na presença de diversos compostos: o marcador de DNA Hoechst, o alcalóide vinblastina, conhecido por interromper a divisão celular eucariótica na metáfase por inibir a polimerização de proteínas do fuso, e o bloqueador de canais de cálcio Verapamil, um conhecido modulador dos transportadores ABC de humanos ABCB1 e ABCC1. Ensaio citotóxicos demonstraram ainda a inibição não competitiva entre Hoechst e Verapamil, apontando a ligação das duas moléculas a diferentes sítios da bomba de efluxo (VELAMAKANNI et al., 2008).

2.5 O sistema *RAD display*

O reparo de DNA por recombinação homóloga é um processo vital para a manutenção da célula. Nesse contexto estão inseridas as recombinases, dentre elas RadA presente em organismos do domínio Archaea e a RAD51 em seres humanos. A recombinase RadA produzida por *Pyrococcus furiosus* atua formando filamentos nucleoproteicos com as fitas de DNA por meio da hidrólise de ATP, tornando o DNA acessível para as etapas seguintes da

recombinação (SEITZ et al., 1998).

Esta enzima foi extensivamente estudada e apresentou alta solubilidade quando produzida a partir de células de *E. coli*, além de notável estabilidade térmica (ROSSMANN et al., 2017). Em se tratando de expressão de proteínas recombinantes *in vitro*, essas são características importantes que driblam diversos problemas encontrados durante sua produção (MARSH et al., 2016). Dessa forma, o sistema *RAD display* foi desenvolvido utilizando-se a sequência gênica responsável pela transcrição da proteína RadA, modificada na região da alça 2 (Ala²⁶⁷ – Gly³⁰²), para comportar sequências de DNA codificadoras de peptídeos diversos (ROSSMANN et al., 2017).

O sistema *RAD display* é, por definição, uma técnica de produção de polipeptídeos alvo inseridos em uma proteína quimérica RadA de *Pyrococcus furiosus*, tendo por características do produto final alta estabilidade térmica e solubilidade, conferidas pela RadA. A técnica possibilita a seleção e caracterização de peptídeos em diversas aplicações podendo-se citar, inclusive, a descoberta de princípios ativos de fármacos (ROSSMANN et al., 2017).

2.6 A inibição de transportadores ABC

A principal característica que faz de importadores ABC alvos interessantes é a ausência da SBP em eucariotos e, portanto, ausência dos mecanismos de interação dessas proteínas com as permeases que culminarão com o transporte nesses organismos (GARMORY; TITBALL, 2004; TANAKA et al., 2018). A importação de nutrientes essenciais está intimamente ligada a sobrevivência de patógenos. Já foi demonstrada a relação entre a influência dos transportadores ABC na adesão ao hospedeiro em *S. aureus* (OTTO; GÖTZ, 2001), *Agrobacterium tumefaciens* (MATTHYSSE; YARNALL; YOUNG, 1996) *Streptococcus* de tipo B (TAMURA; NITTAYAJARN; SCHOENTAG, 2002), entre outros. Porém, o foco principal de mecanismos de inibição desses importadores microbianos, está voltado atualmente a moléculas

que se liguem à SBP (TANAKA et al., 2018), e não às permeases.

Se tratando especificamente de exportadores, a inibição dos mesmos está intimamente ligada ao combate da MDR, já que os exportadores funcionam como bombas de efluxo que expulsam drogas do ambiente celular, fazendo com que as doses administradas de medicamentos sejam superiores para contornar a extrusão das mesmas (JACKSON et al., 2018; ROBEY et al., 2010). Entretanto, até o momento, a inibição de exportadores vêm se mostrando de difícil obtenção (ALAM et al., 2018; NAGY et al., 2001).

O estudo de Lepri e colaboradores (2016) identificou possíveis inibidores de NorA, de *S. aureus*, porém a concentração dos mesmos para que fosse atingida a inibição do transportador se mostra inviável clinicamente. É discutida também a importância de inibidores contra ambos transportadores secundários e ABCs apesar da dificuldade inerente devido à disparidade estrutural entre as duas classes de bombas de efluxo. Alguns inibidores de MDR humanos VX-710 e VX-853 foram associados a uma maior susceptibilidade a antibióticos por diversas bactérias gram positivas, inclusive *S. aureus* em que a resistência a fluoroquinolonas foi parcialmente revertida (MULLIN; MANI; GROSSMAN, 2004).

A vacina V710, desenvolvida para combater infecções nosocomiais causadas por *S. aureus*, contém entre seus componentes antigênicos a proteína LsdB ligadora de heme à superfície extracelular bacteriana. Já demonstrou-se que tal vacina é eficaz em modelos murinos de sepse e bacteremia associada ao uso de cateteres (HARRO et al., 2010). O uso conjunto das proteínas LdB com LsdA, outra proteína de superfície extracelular responsável pela importação de ferro, também se mostrou eficiente na geração de anticorpos opsonizantes em testes desafio em murinos (STRANGER-JONES; BAE; SCHNEEWIND, 2006).

O estudo de Anderson e colaboradores (2012) mostra evidências pré-clínicas do potencial uso da SBP do transportador de manganês de *S. aureus*, MntC, como um dos componentes de uma vacina

multiantigênica usada contra esse patógeno. O fato de MntC estar relacionada a um mecanismo de evasão da imunidade nutricional a torna portanto importante para a evasão do microrganismo contra mecanismos de defesa do hospedeiro.

A técnica *RAD display* (ROSSMANN et al., 2017), que permite a expressão das regiões expostas ao exterior celular das permeases, sejam as mesmas de importadores ou de exportadores, sem ser necessária a produção das proteínas por inteiro, atrelada à produção de anticorpos contra essas regiões de *loop* é, portanto, uma abordagem alternativa apresentada no presente trabalho para inibir transportadores ABC de modo eficaz.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é avaliar a inativação de transportadores ABC do tipo importadores de *E. coli* (maltose, molibdato e vitamina B12), *S. aureus* (maltose e molibdato) e de um exportador de *S. aureus* (Sav1866) por meio do bloqueio da interação entre a proteína ligadora de substrato (SBP) e a permease transmembrana. Para essa finalidade, utilizaram-se anticorpos contra as regiões (*loops*) expostas ao exterior celular das permeases, ou no caso do exportador, por meio do impedimento estérico que os anticorpos trarão ao poro do transportador impossibilitando a extrusão de drogas.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Análises de bioinformática

- Seleção de transportadores de interesse, comparação dos mesmos e identificação das alças periplasmáticas.

- Desenho e síntese dos oligonucleotídeos para clonagem das regiões responsáveis pelas alças externas.

3.2.2 Clonagem das regiões de *loops* e produção das proteínas no sistema RAD display

- Clonagem independente de ligase (LIC) das regiões codificadoras das regiões externas de todos os transportadores.
- Expressão heteróloga das proteínas quiméricas denominadas Rad+*loops* em *E. coli* BL21 (DE3).

3.2.3 Purificação das proteínas

- Purificação das proteínas Rad+*loops* por cromatografia de troca catiônica seguida de cromatografia de exclusão molecular (SEC).

3.2.4 Produção e avaliação dos anticorpos anti-*loops*

- Inoculação das proteínas quiméricas Rad-*loops* em camundongos para produção dos anticorpos policlonais e posterior obtenção do título dos mesmos por meio de ELISA indireto.

3.2.5 Ensaios de avaliação do reconhecimento dos alvos dos diferentes anticorpos

- Avaliação do reconhecimento dos anticorpos por *E. coli* e *S. aureus* em *Whole cell ELISA*, *Western Blotting* e ensaios de imunofluorescência.

3.2.6 Ensaios de inibição de crescimento bacteriano mediado por anticorpos

- Teste de inativação *in vitro* por meio de curvas de crescimento de *S. aureus* em meio mínimo em presença dos anticorpos anti-Rad *loop*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises de bioinformática

Para obtenção das regiões de *loops* periplasmáticos, as sequências primárias das permeases MalG e MalF do transportador de maltose e BtuC do transportador de vitamina B12 de *E. coli* foram obtidas a partir banco de dados KEGG (www.genome.jp/kegg/), do Instituto Central de Bioinformática para investigação em Química da Universidade de Kyoto (www.genome.jp). Após a análise das estruturas depositadas no PDB, respectivamente 2R6G e 2QI9, por meio do visualizador Pymol, versão 1.2.7 (SCHRÖDINGER, 2016), as regiões correspondentes aos *loops* foram identificadas, bem como suas sequências de nucleotídeos. No caso da permease ModB do importador de molibdato, foi utilizada a estrutura do transportador de *A. fulgidus* (código PDB 2ONK). Para obtenção da sequência dos *loops* de ModB de *E. coli*, uma vez que não existe estrutura desse transportador, as sequências das proteínas de interesse foram obtidas no banco de dados KEGG e alinhadas por meio do programa ClustalW (EMBL-EBI, 2016). A partir do alinhamento, da predição de sequências transmembrana da ModB de *E. coli* utilizando o software TMHMM (SONHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998) e do modelo gerado para *E. coli* ModB com o software *I-Tasser* (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010) foram preditas as regiões de interesse.

A obtenção das regiões extracelulares de uma das permeases do importador de maltose, MalD, e do importador de molibdato, ModB, de *S. aureus* foi feita de modo semelhante à de ModB de *E. coli*, se baseando primeiramente na identificação da sequência primária dos mesmos submetendo a sequência das proteínas ortólogas em *E. coli* ao programa Blastp (blast.ncbi.nlm.nih.gov) contra o banco de dados não redundantes (Blastp X nr) com seleção para o organismo *S. aureus* (taxid:1820) e usando os resultados no banco de dados KEGG. Obtidas as sequências de aminoácidos das proteínas correspondentes, foi realizada a análise em conjunto de modelos das proteínas, alinhamentos

e predição de regiões transmembrana, internas e externas. O *loop* extracelular do exportador Sav1866 de *S. aureus* foi obtido de forma direta por meio da visualização da estrutura depositada no PDB de código 2HYD e da sua sequência primária correspondente obtida no KEGG.

4.2 Clonagem independente de Ligase (LIC)

A clonagem independente de ligase LIC (Ligase Independent Cloning) (ASLANIDIS; DE JONG, 1990) foi realizada no vetor pRAD1, desenvolvido para a técnica *Rad Display* (ROSSMANN et al., 2017). Os vetores pRAD1 (aproximadamente 2 µg de massa total) foram tratados com a enzima de restrição *AflI* (New England Biolabs, EUA) a 37°C por 2 h, adicionado dATP (Invitrogen, EUA) até uma concentração final de 0.5 mM e 3 unidades da enzima T4 DNA polimerase (New England Biolabs, EUA). Foi feita a incubação a 37°C por 30 minutos e em seguida a 60°C por 30 minutos. As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 1% e purificadas por eletroforese seguida de kit *gel extraction* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Os oligonucleotídeos foram homogeneizados em concentração equimolar de 10 µM em tampão NEBuffer-4 (New England Biolabs, EUA). A mistura foi aquecida a 90°C por 5 minutos e posteriormente resfriada a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas concentrações equimolares de vetor previamente purificado do gel de agarose.

Os insertos formados por complementariedade por meio dos oligonucleotídeos foram diluídos 10 vezes e homogeneizados em uma relação 1:1 com o vetor. A mistura foi aquecida a 60°C por 5 minutos, resfriada vagorosamente até a temperatura de 40°C e então, mantida em gelo por 20 minutos. O vetor contendo o inserto de interesse foi usado para transformar por choque térmico células de *E. coli* DH5α competentes que foram posteriormente plaqueadas em placas de meio LB (Luria Bertani) ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina. O vetor pRAD1 contendo as sequências de interesse foi produzido em maiores quantidades por meio de inóculos de 5 mL de LB mantidos

por 18 horas à 200 rpm e em seguida submetidos à extração plasmidial por kit *miniprep* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). A presença do inserto foi comprovada por teste de digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI* (ThermoFisher Scientific, EUA) por fim o vetor foi usado na transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3).

4.3 Expressão e purificação das proteínas Rad-loops produzidas pela técnica de *RAD display*

Proteínas quiméricas Rad+*loops* e a proteína RadA sem os *loops* de interesse foram produzidas em células BL21 (DE3) contendo o vetor pUB5520. Esse vetor é codificador do RNAt portador de anticodon de Arginina raro presente na sequência de RadA. As células foram armazenadas a -80°C. As células foram cultivadas em 1 litro de meio de cultura (LB) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de canamicina a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingirem uma densidade óptica (OD 600 nm) de 0.8, quando foram induzidas com 0.4 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG).

As proteínas foram expressas por 3 h a 30°C. Uma alíquota de cultura foi retirada antes da indução, e também ao término do processo, as mesmas foram centrifugadas por 1 minuto a 14.000 rpm para análise em gel SDS page 12%. As células foram coletadas por meio de centrifugação a 4000 x g por 20 minutos a 4°C e os *pellets* estocados a -20°C. A extração das proteínas da fração solúvel foi realizada em 30 mL de tampão MES 20 mM pH 6.0 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), EDTA 0.4 mM, PMSF 1.0 mM e DNase 1 mg/mL. As amostras foram sonicadas por 5 minutos com intervalos de 20 segundos e centrifugadas por 60 minutos a 16.000 rpm em 4°C.

A purificação das proteínas a partir dos extratos solúveis foi realizada por cromatografia de troca catiônica (SP Sepharose Fast Flow GE, Califórnia, EUA). A eluição das proteínas foi realizada por meio de um gradiente de 0 a 1.0 M de NaCl em tampão 20 mM MES pH 6.0 e 0.5 mM EDTA em sistema AKTA start (GE, Califórnia, EUA). Frações correspondentes aos picos nos cromatogramas foram concentradas e

quando necessário submetidas a uma nova etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC) utilizando a coluna Superdex 200 10/300 HiLoad (GE, Califórnia, USA). A coluna foi previamente equilibrada com tampão 20 mM MES pH 6.0 e 0.5 mM EDTA. A análise da expressão e purificação das proteínas nas diferentes etapas foi realizada por meio de SDS-PAGE 12%.

4.4 Produção de anticorpos policlonais

Anticorpos policlonais contra as diferentes proteínas Rad + *loop* foram produzidos em camundongos C57BL/6 fêmeas (10 semanas de idade), imunizados em regime de *prime-boost* homólogo por via subcutânea, no total de cinco doses, com intervalos de 15 dias entre cada uma. As imunizações foram baseadas na combinação de 10 µg da proteína alvo (antígeno) com 1 µg de toxina LT1 de *Escherichia coli* enterogênica (adjuvante). Quinze dias após a última imunização o sangue periférico dos animais (aproximadamente 200 µL – 10 gotas) foi coletado pelo plexo submandibular e acondicionado em gelo por 60 minutos para completa coagulação do sangue. Em seguida, para obtenção do soro, as amostras foram centrifugadas em 5.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O soro foi então coletado e armazenado a -80°C.

4.5 Avaliação do título dos soros por ELISA indireto

Microplacas de poliestireno Maxisorp (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com as proteínas Rad + *loop* purificadas e diluídas em tampão carbonato pH 9.6 (400 ng/poço). As placas foram lavadas três vezes com PBS 1X contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foi feito o bloqueio adicionando-se 200 µl de solução de leite 5% acrescida de albumina de soro bovino (BSA) 0,5% em PBS-T durante 2 horas a 37°C. Após novo ciclo de lavagem, amostras dos soros diluídos partindo de um valor de 1/25 foram adicionadas aos poços e incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos. Depois de um novo ciclo de lavagem, foram adicionados aos

poços 100 μ L da solução de bloqueio acrescida de anticorpo secundário anti-IgG Mouse total (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em diluição 1:5000. A placa foi incubada novamente por 60 minutos e submetida à uma nova lavagem com PBS-T. A revelação foi realizada com 100 μ L/poço de solução reveladora, 10 mg de OPD (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) dissolvidos em 10 mL de solução contendo fosfato de sódio 0.2 M e ácido cítrico 0.2 M pH 4.7 acrescido de 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30% por 15 min, a temperatura ambiente sob abrigo da luz. A revelação foi interrompida com 50 μ L/poço de ácido sulfúrico H₂SO₄ 1.0 M e a leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplaca (Multiscan MS- Labsystems, Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA). Foi considerado como valor de título o primeiro valor de diluição em que a DO 492 nm for igual ao dobro do valor obtido no branco.

4.6 Análises por *Western Blot* para detecção das permeases alvo pelos anticorpos em lisados celulares de *E. coli* e *S. aureus*.

A verificação do reconhecimento das permeases nativas de *E. coli* e *S. aureus* por meio dos soros anti-Rad *loops* foi realizada em ensaio de *Western Blot* conforme protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Amostras das diferentes proteínas Rad + *loop* e de lisados celulares de *E. coli* linhagem DH5 α e *S. aureus* subsp. *aureus* N315 obtidas por meio de choque térmico foram fervidas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Após a corrida, o gel foi submerso no tampão de transferência (Tris 150 mM, Glicina 50 mM e 20% de Metanol), assim como a membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Merck, Kenilworth, NJ, USA.) e filtros de papel. Depois de 10 minutos imersos, a corrida de transferência foi realizada por 30 minutos, a 100 V, através de sistema de transferência (BioRad, Santo Amaro, SP, Brasil). Terminada a corrida, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão Tris-Buffer-Saline (TBS – Tris 150 mM, NaCl 50 mM) e foram lavadas sucessivamente com TBS 1X. Em seguida, foram submetidas aos anticorpos primários anti-Rad+*loop*, nas

diluições correspondentes á valores superiores aos seus títulos anti-Rad *scaffold* quando o mesmo foi inferior ao título anti-Rad *loop*, quando não, foi usado o valor de título como fator de diluição. Os anticorpos primários ficaram em contato com a membrana durante duas horas, sob leve agitação. Depois desse período, as membranas foram lavadas sucessivamente, e por fim, o anticorpo secundário anti-IgG Mouse, conjugado à fosfatase alcalina (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi diluído na proporção de 1:20000 e incubado por duas horas. A revelação da membrana foi realizada por meio de reação colorimétrica derivada da reação da fosfatase alcalina e seu substrato NBT-BCIP AP (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.7 Análises por *Whole cell ELISA* para detecção das permeases alvo pelos anticorpos em células inteiras de *E. coli* e *S. aureus*.

A verificação do reconhecimento das permeases nativas de *E. coli* e *S. aureus* por meio dos soros anti-Rad *loops* em células inteiras sem terem passado por procedimentos de lise, e portanto mostrando a efetividade do anticorpo em alcançar seu alvo, foi realizada em ensaio de *Whole Cell ELISA* (WCE) conforme protocolo descrito por Elder e colaboradores (1982). Células e *E. coli* linhagem DH5 α e *S. aureus* subsp. *aureus* N315 foram cultivadas em meio LB até uma DO de 0.5 a 30°C sob agitação de 200 rpm, em seguida submetidas à centrifugação a 5000 rpm por 20 mins. O *pellet* foi posteriormente lavado 3x em PBS e após a terceira lavagem ressuspendido no mesmo volume de PBS. 100 μ L de suspensão celular foram adicionados por poço em placas de poliestireno MaxiSorp (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) assim como 400 ng de proteínas Rad+*loops* em poços adjacentes. As placas foram mantidas a 37°C por 18 horas e as etapas seguintes de bloqueio e incubação com os anticorpos primários anti-Rad + *loop* foram conduzidas como descrito previamente para ensaio de ELISA.

Os anticorpos primários foram utilizados em diluição igual a usada para o ensaio de *Western Blot* e incubados por 60 minutos. Após etapas de lavagem realizadas com velocidade diminuída de pipetagem com

PBS-T, foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG total (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em diluição 1:5000, sendo a placa, em seguida, incubada novamente por 60 minutos. Posteriormente foi realizada nova lavagem em baixa velocidade com PBS-T. A revelação foi realizada com 100 μ L/poço de solução reveladora, 10 mg de OPD (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) dissolvidos em 10 mL de solução contendo fosfato de sódio 0.2 M e ácido cítrico 0.2 M pH 4.7 acrescido de 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30% por 15 min, á temperatura ambiente sob abrigo da luz.

A revelação foi interrompida com 50 μ L/poço de ácido sulfúrico H₂SO₄ 1.0 M e a leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplaca (Multiscan MS-Labsystems, Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA).

4.8 Reconhecimento das diferentes permeases de *E. coli* e *S. aureus* por meio dos anticorpos anti-Rad *loops* em ensaio de imunofluorescência

A ligação dos anticorpos anti-Rad *loop* com seus respectivos antígenos componentes de regiões externas da membrana plasmática de permeases de transportadores ABC foi avaliada por meio de imunofluorescência (MORAES et al., 2015). Células de *E. coli* DH5 α e *S. aureus* subsp. *aureus* N315 foram cultivadas em meio LB por 18 horas e posteriormente 1 mL das culturas foi centrifugado a 4.500 rpm por 5 minutos. Os *pellets* foram lavados duas vezes com PBS e ressuspensos por fim em 500 μ L de PBS. A fixação das células foi feita em placa *black immunoplate* (Corning, Nova Iorque, EUA) com 200 μ L de PFA 4% em gelo por 15 minutos. As bactérias fixadas foram lavadas em PBS 0.01 M pH 7.4 e o bloqueio foi feito em solução de PBS 0.1 M acrescido de 1% de BSA na presença e ausência de 1% de saponina em kit *cytofix cytoperm* (BD Biosciences, Santo Amaro, Brasil) a temperatura ambiente por uma hora.

Realizou-se posteriormente nova lavagem com PBS e incubação por 2 horas com os anticorpos primários anti-Rad MalG *loop* produzido neste trabalho e anti-GroEL (cedido gentilmente pela profa. Dra.

Roxanne Piazza do laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo – SP), em diluição 1:400 para os poços contendo *E. coli* e anti-Rad MaID para os poços contendo *S. aureus*, todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio acrescida ou não de saponina. Após nova lavagem com PBS as amostras foram incubadas por uma hora com anticorpo secundário anti-igG Mouse Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA) em diluição 1:100 em solução de bloqueio com e sem detergente, a placa foi mantida ao abrigo da luz a partir dessa etapa. Por fim, realizou-se nova lavagem e incubação com o marcador de ácido nucléico Hoechst 33258 (Invitrogen, Califórnia, EUA) por 10 minutos. As células foram visualizadas em microscópio EVOS FI Cell imaging system (Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA) com magnificação de 400x em diferentes canais de fluorescência.

4.9 Crescimento de *S. aureus* em meio mínimo em associação de anticorpo anti-Rad MaID loop.

Com a finalidade de testar se anticorpos anti-*loops* externos de permeases transportadores ABC eram capazes de inibir o crescimento bacteriano, foi realizado em duplicata o cultivo bacteriano em meio mínimo. Células de *S. aureus* subsp. *aureus* N315 foram mantidas crescendo em LB por 18 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, as mesmas foram lavadas 3x por meio de centrifugação a 5000 rpm e resuspensão em solução salina 0.9 % NaCl, e por fim, inoculadas em 50 mL de meio mínimo M9 (RUDIN et. al, 1974) [Na₂HPO₄ 33.7 mM, KH₂PO₄ 22.0 mM, NH₄Cl 9.35 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0.3 mM, Tiamina 1 µg (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), casaminoácidos 1% (BD Biosciences, Santo Amaro, Brasil) e maltose 4 %]. As células foram mantidas crescendo sob agitação de 200 rpm e 37°C até uma DO de 0.3 na qual adicionou-se ao meio de cultura o anticorpo anti-Rad MaID loop e soro ausente de IgGs em diluições 1:5000 e 1:10.000.

Amostras de 10 µL foram colhidas no momento da adição dos anticorpos e 1, 2 e 4 horas após a mesma. Em seguida realizaram-se diluições seriadas em solução salina 0.9% NaCl e ao fim das

transferências, 100 µL das amostras correspondentes às diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram plaqueadas em Ágar-Sal Mannitol (KASVI, Paraná, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e posteriormente as CFUs/mL foram calculadas pela fórmula a seguir (DUNLAP; MADIGAN; MARTINKO, 2010):

$$CFU/mL = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias} \cdot \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de bioinformática

Estudos iniciais realizados pelo nosso grupo procuraram inicialmente encontrar modelos de transportadores ABC presentes em *E. coli* com estrutura caracterizada e ensaios biofísicos bem estabelecidos, de forma que não houvesse dúvidas em relação às regiões periplasmáticas denominadas de *loops* e que seriam escolhidas. Foram selecionados três transportadores: (i) o transportador relacionado à importação de maltose MalEFGK, com seu domínio TMD composto por permeases distintas, denominadas MalF e MalG, heterodímeros inseridos na membrana plasmática (OLDHAM, CHEN, 2011), (ii) o transportador de molibdato de *A. fulgidus* ModABC, em que homodímeros de ModB compõem o domínio TMD (GERBER et al., 2008) e, (iii) o transportador responsável pela captação de vitamina B12, cujo domínio TMD é composto por BtuC (KORKHOV; MIREKU; LOCHER, 2012). Ressalta-se que os três transportadores apresentam extensa literatura tanto do ponto de vista funcional como estrutural.

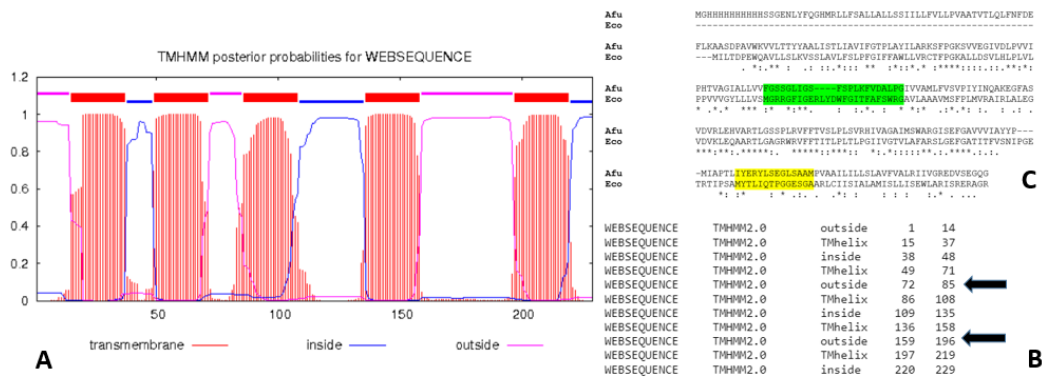


Figura 6 - Análise de bioinformática para identificação dos loops de ModB de *E. coli*. **A** Resultado do software TMHMM para predição das regiões transmembrana, periplasmáticas e citoplasmáticas de ModB de *E. coli*. **B** Regiões periplasmáticas correspondentes aos loops de ModB de *E. coli*. **C** Alinhamento realizado utilizando o programa ClustalW (EMBL-EBI, 2016) das sequências de ModB de *A. fulgidus* e *E. coli*, sendo os loops periplasmáticos L1 e L2 destacados em verde e a amarelo, respectivamente.

O transportador de molibdato de *A. fulgidus* é muito conservado em relação ao de *E. coli*, e por isso, no caso de ModB de *E. coli* usamos este como parâmetro para determinação dos loops. As sequências de *E. coli* e *A. fulgidus* foram alinhadas com o programa ClustalW (EMBL-EBI, 2016) e, associado às análises das regiões periplasmáticas obtidas por meio do software TMHMM (SONHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998), e estruturais, foram identificadas as sequências dos loops, conforme apresentado na Figura 6.

No caso dos demais transportadores com estrutura resolvida, identificamos nas permeases as regiões expostas ao periplasma que estão em contato direto com as proteínas ligadoras. Um esquema dos três transportadores e as regiões expostas em cada um deles foi obtido pelo visualizador Pymol, versão 1.2.7. (SCHRÖDINGER, 2016) e é evidenciado na Figura 7.

Com o objetivo adicional de testarmos a inibição de transportadores de uma bactéria gram positiva e levando-se em consideração a relevância médica atribuída ao patógeno *Staphylococcus aureus* (AHUJA et al., 2015; GRIM et al., 2017; OTTO; GÖTZ, 2001), o mesmo foi escolhido como organismo alvo. Para essa bactéria também usamos como alvo os importadores de maltose e molibdato para futuras comparações com os resultados

de *E. coli*.

A identificação dos ortólogos de MalG e ModB em *S. aureus* se deu por meio do programa Blastp usando-se como entrada as sequências primárias das proteínas de *E. coli* contra o banco de dados não redundantes (Blastp X nr) com seleção para o organismo *S. aureus* (taxid:1820).

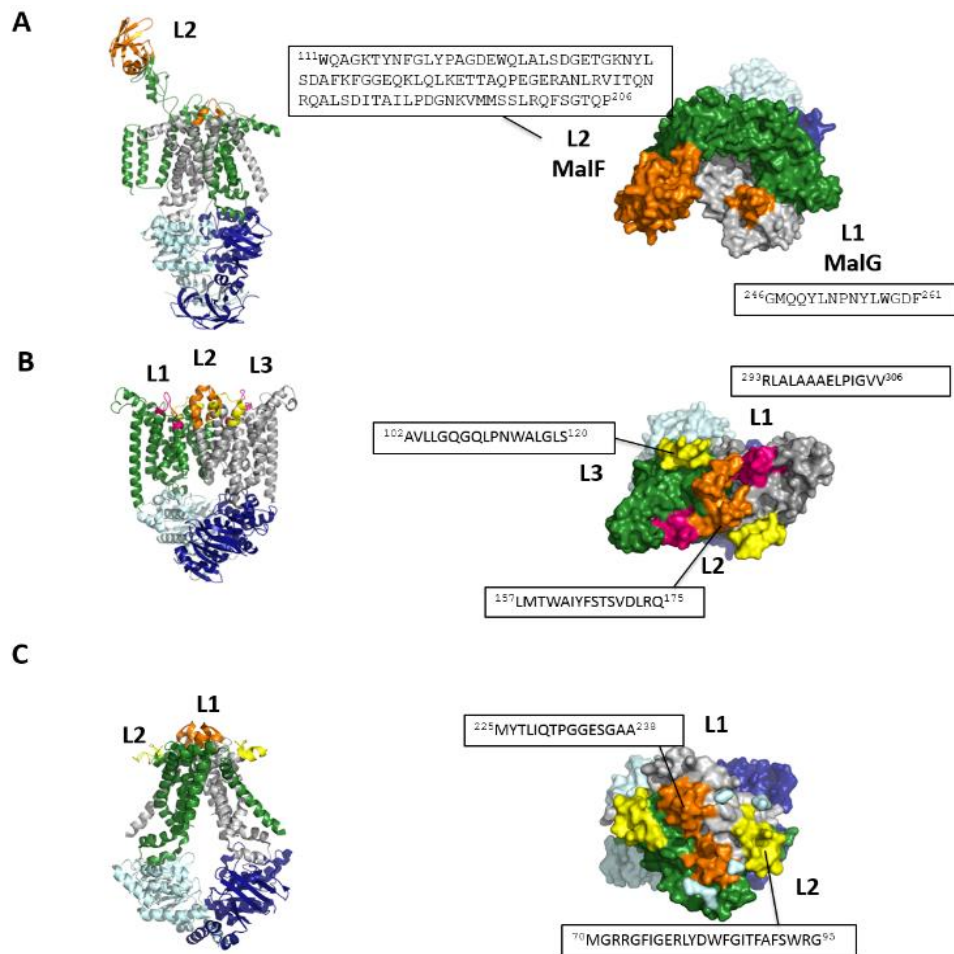


Figura 7 - Representação da estrutura dos transportadores de maltose, molibdato e vitamina B12 de *E. coli* e seus respectivos loops expostos ao periplasma. A Estrutura do transportador de maltose e os heterodímeros que compõe seu domínio TMD MalF e MalG, com realçe em laranja para as regiões expostas que foram escolhidas para inativação do transportador, L1 e L2 pertencentes a MalG e MalF respectivamente seguidos da estrutura primária de cada região. **B** Estrutura do transportador de vitamina B12 sendo os loops pertencentes ao seu domínio TMD denominados L1, L2 e L3, com realçe em rosa, laranja e amarelo respectivamente, seguidos de suas estruturas primárias. **C** Estrutura do transportador de molibdato sendo o loop voltado ao periplasma realçados em laranja, L1, e amarelo, L2, respectivamente seguidos de sua sequência primária.

Obteve-se respectivamente, a proteína MalD de (cobertura 94% e identidade 39%), previamente anotada como uma permease do importador de maltodextrinas no KEGG (referência SA0209), e a proteína ModB (cobertura 89% e identidade 38%), previamente anotada

como a permease do importador de molidênio no KEGG (referência SA2073). O *locus* gênico de *malD* e *modB* também foi analisado e ambos os genes fazem parte de operons contendo o transportador ABC completo para importação de maltose e molibdato em *S. aureus*, o que corrobora a identificação correta das proteínas como as permeases dos alvos escolhidos. Uma relação de todos os operons codificantes dos transportadores ABCs utilizados como alvo neste trabalho pode ser encontrada na Figura 8. As SBPs correspondentes aos importadores de maltose e molibdato de *S. aureus*, MalE e ModB (KEGG SA0207 e SA2074, respectivamente), também tiveram suas sequências analisadas. A presença da região *lipobox* no C-terminal dos peptídeos sinais foi confirmada em todas as sequências (Figura 8). Posteriormente, as permeases MalD e ModB foram analisadas quanto às suas regiões externas, transmembrana e externas, com uso do software TMHMM (SONHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998).

Por meio das análises realizadas no software TMHMM, ModB foi predita com 5 α -hélices transmembrana (Figura 9A), uma a menos que o descrito para o transportador de *A. fulgidus* (HOLLENSTEIN; FREI; LOCHER, 2007). O *loop* extracelular predito como mais proeminente e escolhido como alvo, foi o presente entre as hélices 4 e 5 (Leu¹⁶⁴ a Leu¹⁷⁷) (Figura 11A), condizente com o *output* de região externa do TMHMM (Figura 9B).

A disparidade da localização dos resíduos do *loop* de interação de *A. fulgidus* quando analisada no alinhamento com a ModB de *S. aureus* é decorrente do fato que a proteína de *S. aureus* apresenta um tamanho menor e uma α -hélice transmembrana a menos que a proteína ModB de *A. fulgidus*.

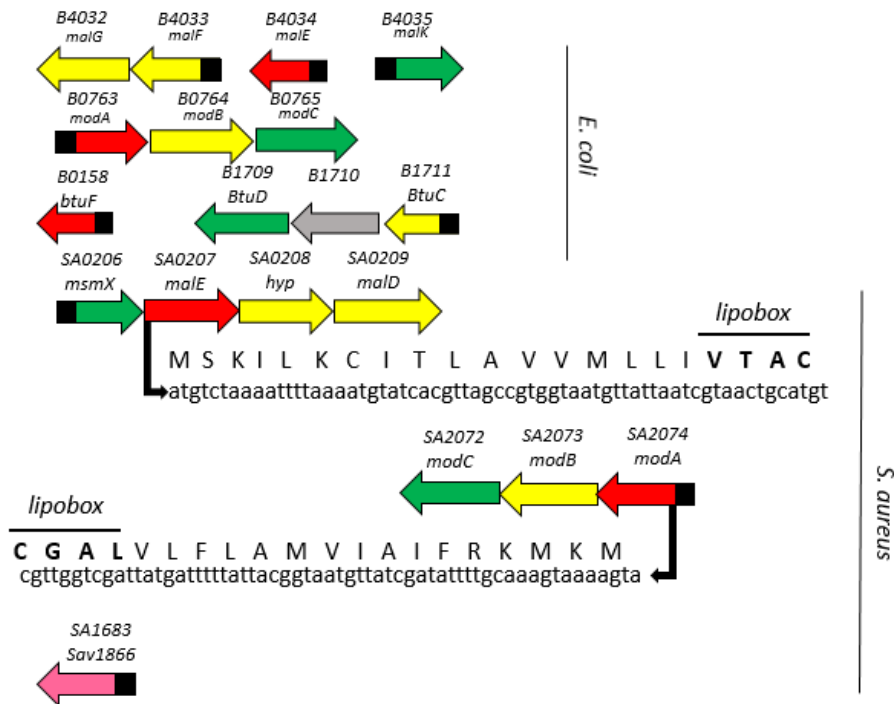


Figura 8 - Relação dos operons e ORFs de todos os ABCs de *E. coli* e *S. aureus* utilizados como alvo no presente trabalho. Flechas indicam o sentido das ORFs no genoma dos respectivos organismos, seguidas dos genes e sua referência no KEGG. Cores indicam a função da proteína transcrita pela região correspondente no ABC funcional: Amarelo para permeases, verde para ATPases, vermelho para SBPs, cinza para proteínas não relacionadas ao ABC mas transcritas pelo mesmo operon e rosa para o monômero do exportador Sav1866 contendo ambos domínio NDB ATPase e TMD permease. Regiões em preto indicam promotores e flechas adjacentes indicam genes policistrônicos. Para *malE* e *modA*, que transcervem as SBPs de importadores em uma gram positiva, é mostrada a região 5' dos genes e a sequência primária correspondente aos aminoácidos do peptídeo sinal, com ênfase para o motivo *lipobox* [(Leu/Val/Ile)(Ala/Ser/Thr/Gly)(Gly/Ala)Cys] que comprova que as proteínas estão ancoradas à membrana plasmática.

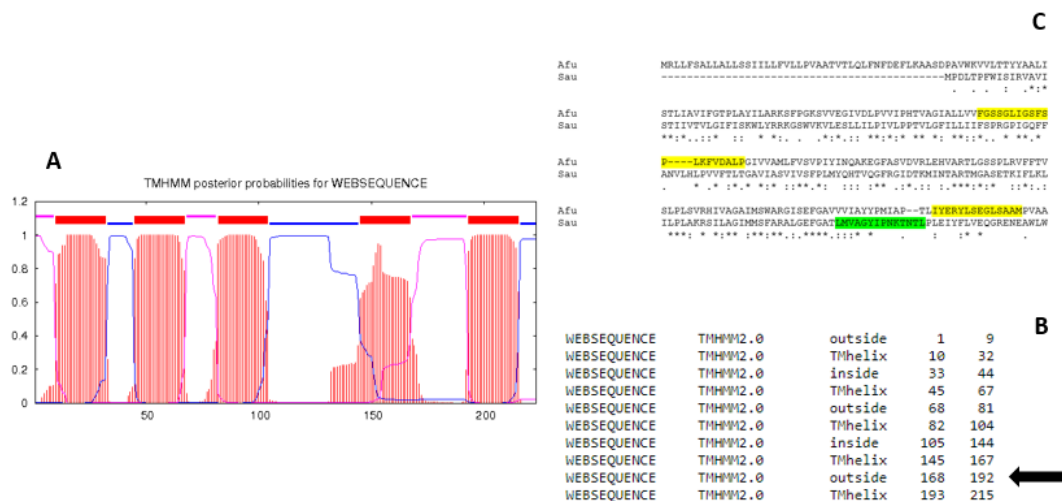


Figura 9 - Análise de bioinformática para identificação dos loops de ModB de *S. aureus*. A Resultado do software TMHMM para predição das regiões transmembrana, perioplasmáticas e citoplasmáticas de ModB de *S. aureus*. B Regiões externas correspondentes ao *loop* externo mais proeminente de ModB, a flecha indica a região externa em que se encontra o *loop* escolhido como alvo. C Alinhamento das sequências de ModB de *A. fulgidus* e *S. aureus* realizado com o programa ClustalW (EMBL-EBI, 2016), evidenciando os *loops* perioplasmáticos de *A. fulgidus* destacados em amarelo e o *loop* escolhido como alvo para *S. aureus* em verde, respectivamente.

A predição de hélices transmembrana da MalD, o ortólogo de MalG em *S. aureus*, foi de 6 α -hélices, o que condiz com o descrito para *E. coli* (OLDHAM et al., 2007) (Figura 10A). Apesar de um de seus *loops* extracelulares mais proeminentes ser encontrado entre as hélices 5 e 6 no TMHMM (Figura 10B), os resíduos entre Gly¹⁷⁰ e Ala¹⁸⁸ se apresentaram em uma região mais exposta, de acordo com o modelo gerado pelo *I-Tasser* (Figura 11B), e próxima ao *loop* de interação descrito na estrutura de MalG de *E. coli* (OLDHAM et al., 2007) (Figura 10C). Essas análises foram importantes para a escolha da região como alvo.

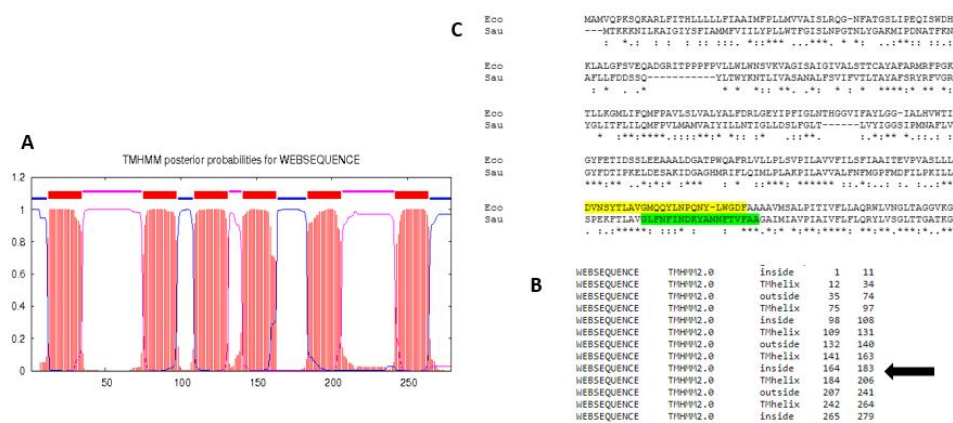


Figura 10 - Análise de bioinformática para identificação dos *loops* de MalD de *S. aureus*. **A** Resultado do software TMHMM para predição das regiões transmembrana, periplasmática e citoplasmática de MalD de *S. aureus*. **B** Regiões transmembrana, internas e externas de MalD de acordo com TMHMM, a flecha indica a região onde se encontra o alvo escolhido como *loop*. **C** Alinhamento realizado utilizando o programa ClustaW (EMBL-EBI, 2016) das sequências de MalG de *E. coli* e MalD de *S. aureus*, estando o *loop* periplasmático de MalG destacado em amarelo e o *loop* escolhido em MalD em verde, respectivamente.

Foi realizada a análise das regiões de *loops* extracelulares da estrutura depositada do exportador Sav1866 de *S. aureus* (PDB: 2HYD) no visualizador Pymol, versão 1.2.7, e atrelado ao descrito por Dawson e Locher (2016), a região entre Ala⁴⁰ e His⁵⁸ foi escolhida como alvo para clonagem no sistema *RAD display* para testar inibição da extrusão de drogas por meio de anticorpos (Figura 11 C).

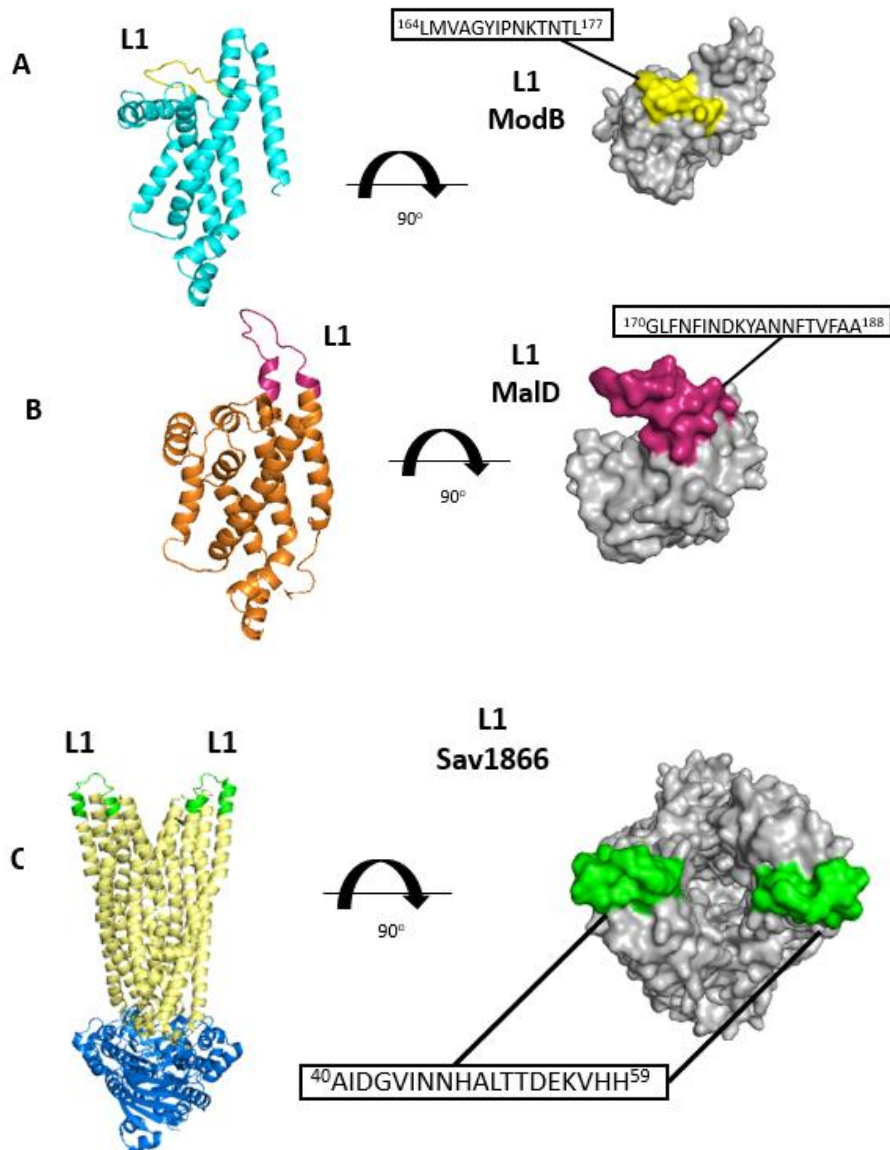


Figura 11 - Representação da estrutura das permeases ModB, MalD e o exportador Sav1866 de *S. aureus* e seus respectivos *loops* expostos ao periplasma. A Modelo da permease de importação de molibdato ModB em ciano com realce em amarelo para a região L1 de *loop* escolhida como alvo para inibição do transportador, seguida de sua estrutura primária. **B** Modelo gerado para a permease MalD componente do transportador de maltodextrinas em laranja com realce em roxo para a região L1 predita como externa e escolhida como alvo para inibição da importação seguida de sua estrutura primária. **C** Estrutura em homodímero do exportador de drogas Sav1866 (DAWSON; LOCHER, 2006) (PDB: 2HYD) sendo os domínios TMD e NBD realçados de amarelo e azul, respectivamente. A região escolhida como alvo L1 para inibição é realçada em verde, seguida de sua sequência primária.

5.2 Clonagem independente de Ligase (LIC)

Após a identificação das regiões expostas e alças de cada permease (MalG, MalF, BtuC e ModB para os transportadores ABC de *E. coli* e MalD, ModB e Sav1866 para os transportadores de *S. aureus*), foram desenhados os oligonucleotídeos usados para

clonagem dos *loops* (ANEXO 1). Os insertos foram inseridos no vetor pRAD1 do sistema *RAD display*.

Com os oligonucleotídeos em mãos foram realizados os primeiros ensaios de clonagem utilizando-se a metodologia LIC (Figura 12). Após a ligação e transformação das células de *E. coli* DH5 α , foi comprovada a clonagem de 6 das 7 construções de *E. coli* e das 3 construções de *S. aureus* por testes de restrição (Figura 13) utilizando as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI*, após essa etapa. Os diversos *loops* clonados têm tamanhos variando desde 42 (*S. aureus modB loop*) a 75 resíduos (*E. coli modB loop 1*) pares de base, estando os mesmos inseridos entre os sítios de *HindIII* e *XhoI* no vetor pRAD1. Por meio de digestão enzimática simultânea com as duas enzimas, o vetor vazio contendo apenas a sequência de *rad scaffold* gera fragmentos de tamanhos 410 e 260 pares de base, ao passo que o vetor contendo as sequências de interesse clonadas gera um fragmento de 410 pares de base e outro de tamanho variando entre 302 e 335 pares de base.

Realizando eletroforese em gel de agarose 1% de vetor vazio e vetor contendo a sequência alvo, é possível detectar visualmente a presença do inserto no fragmento de menor massa molecular obtido por meio de clivagem do vetor pRAD1 que passou pelos procedimentos de LIC com as enzimas *HindIII* e *XhoI* (Figura 13). Hipotetiza-se que o *loop* de *E. coli malF* não foi clonado por conta de seu tamanho muito maior em comparação aos demais (288 pares de base), o que demandou o uso de um número maior de oligonucleotídeos utilizados, o que pode aumentar a chance de pareamento incorreto das sequências formando estruturas de *hairpin* que impossibilitam a correta inserção da sequência alvo no vetor (ANEXO 1).

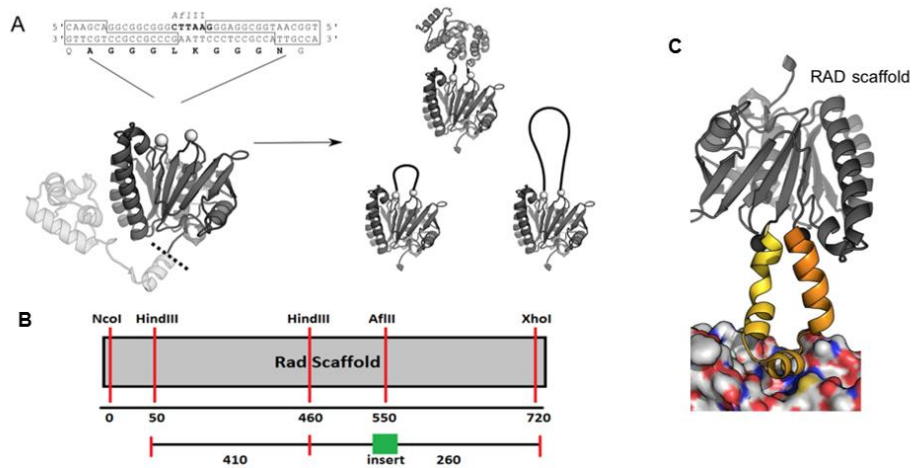


Figura 12 - Esquema da clonagem independente de ligase (LIC) no vetor pRAD e exposição dos loops de interesse. **A** Sítio de restrição *AflIII* presente no vetor pRAD1, contendo o scaffold RadA de *Pyrococcus furiosus*, onde os insertos foram clonados por LIC. A estrutura de RadA e localização do sítio de inserção de regiões de interesse é mostrada. Imagem retirada de ROSSMANN et al., 2017. **B** Esquema dos sítios de restrição presentes na sequência gênica de *radA* de pRAD1 utilizados posteriormente para os testes de restrição com *HindIII* e *XhoI*. **C** Esquema da proteína RadA scaffold quimérica apresentando regiões de α -hélices específicas de uma proteína de interesse, mostrada em cartoon amarela e laranja.

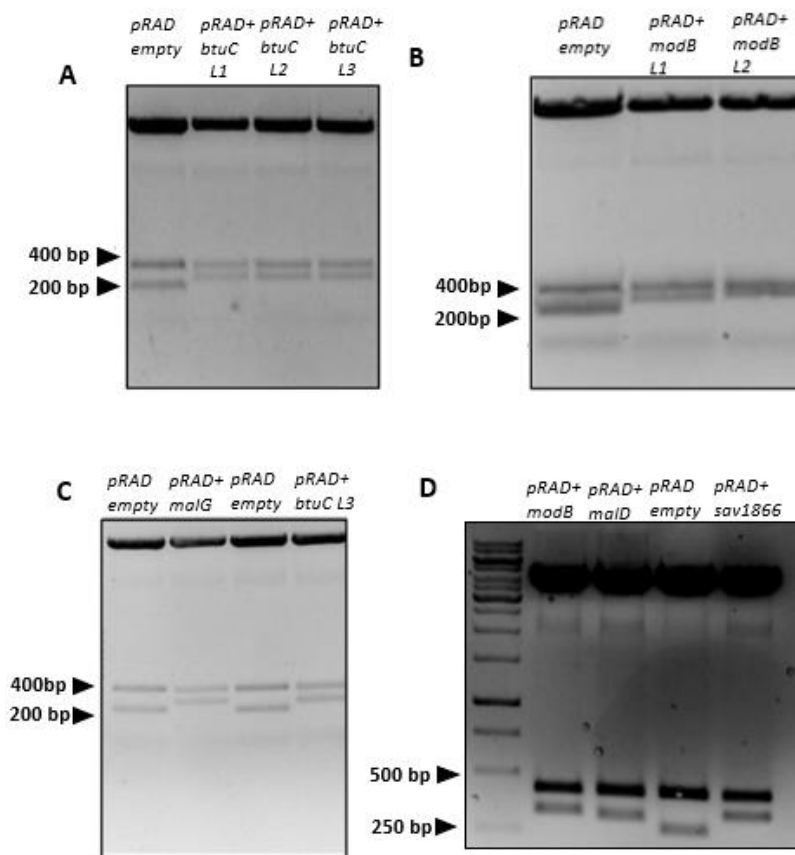


Figura 13 - Testes de restrição. Eletroforese de DNA utilizando géis de agarose 1%, o vetor pRAD sem qualquer inserto foi utilizado como controle negativo. O DNA foi digerido com as enzimas *HindIII* e *XhoI* gerando fragmentos de aproximadamente 410 e 260 pares de base no caso do controle negativo. **A** Amostras de *radA* acrescida dos três loops de *btuC* de *E. coli*. **B** Amostras de *radA* acrescida dos dois loops de *modB* de *E. coli*. **C** Amostra do loop de *malG* e terceiro loop de *btuC* de *E. coli*. **D** Amostras de *radA* + loops de *modB*, *malD* e *sav1866* de *S. aureus*.

5.3 Expressão e Purificação das proteínas Rad+loops

Em seguida, realizaram-se testes de expressão das proteínas RAD-loops em células de *E. coli* BL21 (DE3) portadoras dos vetores pRAD+loops após indução com 0.4 mM de IPTG durante 3 horas a 30°C. A Figura 14 mostra o resultado da eletroforese em géis de poli-acrilamida 12% evidenciando a presença de todas Rad+loops de interesse após indução (T2). As proteínas de interesse são mostradas nas frações solúvel e insolúvel.

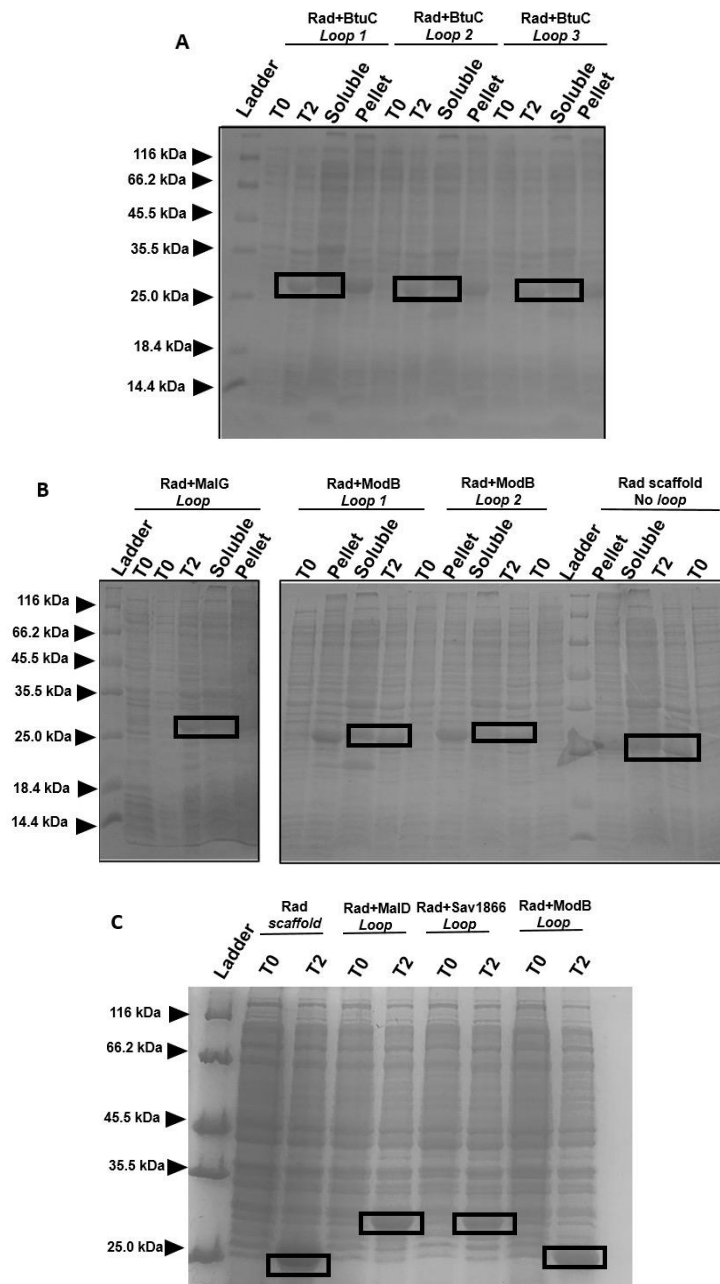


Figura 14 - SDS-PAGE dos testes de expressão das diferentes proteínas Rad+loops. A Expressão da Rad+loops da permease BtuC do transportador de vitamina B12 de *E. coli*. BtuC loop 1 (C1), BtuC loop 2 (C2), BtuC loop 3 (C3). T0: antes da indução, T2: 3 horas após indução com 0.4 mM IPTG. B Expressão da Rad+loops das permeases dos transportadores de maltose (MalG) e de molibdato (ModB, loop B1, B2 e B3) e da Rad sem loop, usada como controle. C Expressão da Rad+loops das permeases dos transportadores de maltose (MalD loop), molibdato (ModB loop) e o exportador Sav1866 (Sav1866 loop) de *S. aureus*. Ladder: Marcador de massa molecular.

Concluídos os testes de expressão, as frações solúveis da expressão das 10 proteínas passaram por uma etapa inicial de purificação por troca catiônica, em coluna SP Sepharose Fast Flow (GE, Califórnia, EUA). Parâmetros das sequências das proteínas Rad+loops necessários para os futuros ensaios, incluindo as purificações, são apresentados na Tabela 1. A massa molecular média das proteínas foi de 27 kDa, uma vez que os insertos tinham tamanhos similares.

Tabela 1 - Análise dos loops alvo quanto à sua sequência, pI e Massa molecular. Identificação dos diferentes loops clonados com sucesso no sistema *RAD display* e sua correspondente sequência primária com aminoácidos carregados em *bold*, pI teórico e massa molecular total do loop acrescido à Rad scaffold em kDa.

Construção	Sequência primária do loop inserido	pI teórico	Massa Molecular total Rad scaffold + loop (kDa)
Rad scaffold	-	7.15	25.9
Rad + <i>E. coli</i> BtuC loop 1	AVLLGQGQLPNWALGLC	7.14	27.6
Rad + <i>E. coli</i> BtuC loop 2	LMTWAIYFSTSVDLRQLM	7.15	28.1
Rad + <i>E. coli</i> BtuC loop 3	RLALAAAEPLIGVV	7.15	27.3
Rad + <i>E. coli</i> ModB loop 1	MGRRGFIGERLYDWFGITFA FSWRG	8.78	28.9
Rad + <i>E. coli</i> ModB loop 2	MYTLIQTPGGESGA	6.79	27.3
Rad + <i>E. coli</i> MalG loop	GMQQYLNQPNYLWGDF	6.76	27.9
Rad + <i>S. aureus</i> MalD loop	GLFNFINDKYANNFTVFAA	7.15	28.9
Rad + <i>S. aureus</i> ModB loop	LMVAGYIPNKTNTL	7.99	27.4
Rad + <i>S. aureus</i> Sav1866 loop	AIDGVINNHALTTDEKVHH	6.64	28.0

As proteínas foram eluídas entre 0.3 M e 0.5 M NaCl e amostras de todas as etapas incluindo *flow through* e lavagem foram analisadas em gel de poli-acrilamida 12% em SDS-PAGE. As proteínas com loops de *E. coli* Rad+loops (MalG loop, BtuC loop 2, BtuC loop 1 e Rad scaffold vazia) tiveram comportamento semelhante na troca catiônica, com exceção de Rad+ModB loop 1 que não foi purificada por não ter

interagido com a coluna de troca catiônica (Figura 15). Não sabemos descrever ao certo o motivo da não interação, mas podemos inferir que a proteína provavelmente adquiriu características muito diferentes da nativa. Por outro lado, Rad + BtuC *loop* 2 e Rad + BtuC *loop* 3 já foram obtidas a partir da troca catiônica com 95% de pureza e não necessitaram de uma etapa de cromatografia por exclusão molecular. Após as etapas de troca catiônica, as proteínas Rad *scaffold*, Rad + BtuC *loop* 1, Rad + MalG *loop* e Rad+modB *loop* 2 foram concentradas e submetidas à cromatografia por exclusão molecular (SEC) utilizando a coluna Superdex 200 10/300 HiLoad (GE, Califórnia, USA). A purificação resultou em amostras que demonstraram 95% de pureza em SDS-PAGE. As proteínas foram então quantificadas e estocadas em 4°C para posterior etapa de imunização.

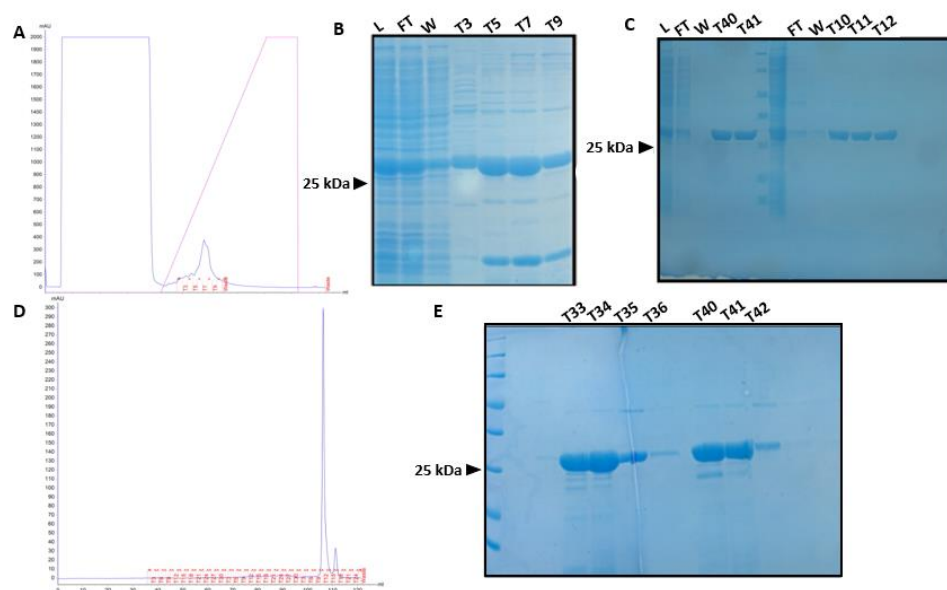


Figura 15 - Purificação das proteínas Rad + loops de *E. coli*. **A** Cromatograma obtido na purificação por troca catiônica de Rad + MalG *loop*. A proteína eluiu da coluna com concentrações de NaCl entre 0.3 e 0.4 M. **B** Gel de poliácridamida 12% após eletroforese das amostras obtidas na purificação de Rad+ MalG *loop* por troca catiônica. L: Fração solúvel obtida após lise, FT: *Flow through* W: Lavagem T3,T5,T7,T9: Amostras de diferentes regiões do pico obtido no cromatograma A. **C** Gel de poliácridamida 12% obtido após eletroforese das amostras da purificação de Rad + BtuC *loop* 2 e Rad + BtuC *loop* 3 por troca catiônica. T40 e T41 equivalem a amostras da purificação de Rad + BtuC *loop* 2, e T10, T11 e T12 equivalem a amostras da purificação de Rad + BtuC *loop* 3. **D** Cromatograma obtido na purificação SEC de Rad + MalG *loop*. **E** Gel de poliácridamida 12% após eletroforese das amostras obtidas na purificação de Rad+ MalG *loop* T33, T34, T35 e T36 e Rad + BtuC *loop* 2 T40, T41 e T42 por SEC. As frações de maior pureza foram quantificadas e armazenadas a 4 °C.

Dentre as proteínas Rad + *loops* de permeases de *S. aureus*, apenas Rad+MalD *loop* eluiu da coluna de troca catiônica, porém com muitos contaminantes, necessitando de uma etapa adicional de

purificação por SEC. Ao fim do processo, a proteína Rad+MalD *loop* apresentou frações de maior concentração, ainda com muitos contaminantes, e uma única fração de alta pureza (T88) (Figura 16D), que foi armazenada a 4°C. Acreditando-se que *E. coli* Rad + ModB *loop* 1, *S. aureus* Rad + ModB *loop* e Rad + Sav1866 *loop* não puderam ser purificadas por conta dos seus pontos isoelétricos não possibilitarem uma protonação eficiente dos resíduos carregados em pH 6.0, novas rodadas de purificação foram realizadas em tampões com diferentes de pHs, mas ainda assim não houve um resultado satisfatório na purificação. Outra possibilidade é que as regiões inseridas na Rad tenham alterado a estrutura da mesma, tornando-a menos estável. Novas construções podem ser realizadas no futuro, alterando-se a faixa dos resíduos escolhidos inicialmente. Etapas de purificação das construções contendo *loops* de *S. aureus* são mostradas na Figura 16.

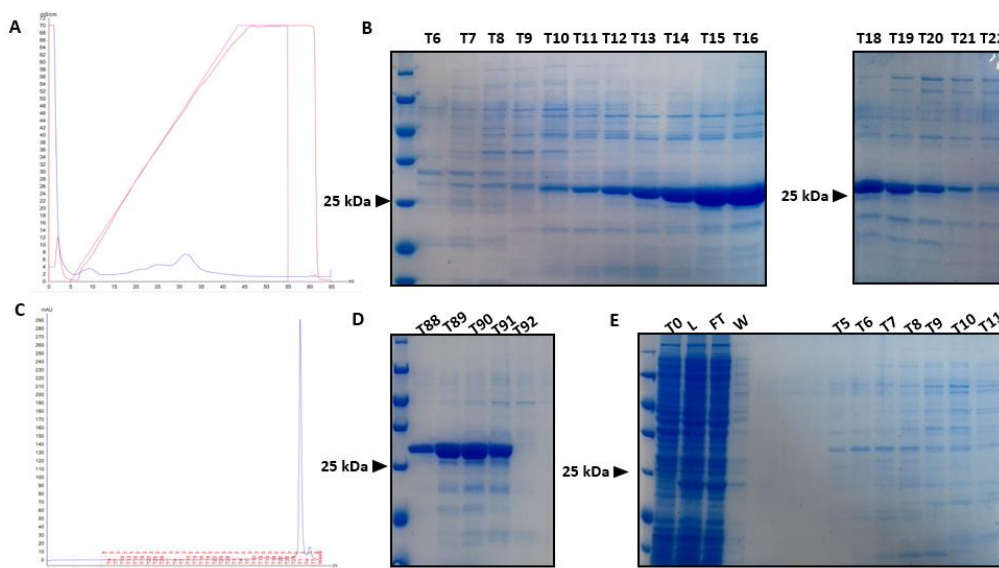


Figura 16 - Purificação das proteínas Rad + *loop* de *S. aureus*. **A** Cromatograma obtido na purificação por troca catiônica de Rad + MalD *loop*, a proteína eluiu da coluna com concentrações de 0.1 e 0.5 M de NaCl. **B** Gel de poliacrilamida 12% após eletroforese das amostras obtidas na purificação de Rad + MalD *loop* por troca catiônica. T6-T22: amostras correspondentes ao pico obtido no cromatograma A. **C** Cromatograma obtido na SEC de Rad + MalD *loop*. **D** Gel de poliacrilamida 12% após eletroforese das amostras obtidas na purificação de Rad+ MalD *loop* T88-T92 por SEC. A fração de maior pureza (T88) foi quantificada e armazenada a 4 °C. **E** Gel de poliacrilamida 12% das amostras obtidas após tentativa de purificação de Rad + Sav1866 *loop*. T0: amostra anterior à indução com IPTG, L: Fração solúvel obtida após a lise, FT: Flow through, W: Lavagem, T5-T11: amostras obtidas na troca catiônica.

Ao final de todas as etapas de purificação, as frações de pureza igual ou superior a 95% foram concentradas até um volume final de 2 mL e quantificadas para a realização das etapas de imunização e produção dos anticorpos (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração das proteínas após todas as etapas de purificação.

Proteína (abreviação)	Concentração final (µg/mL)
Rad <i>scaffold</i> (R)	860
Rad + <i>E. coli</i> BtuC <i>loop</i> 1 (C1)	800
Rad + <i>E. coli</i> BtuC <i>loop</i> 2 (C2)	775
Rad + <i>E. coli</i> BtuC <i>loop</i> 3 (C3)	680
Rad + <i>E. coli</i> ModB <i>loop</i> 2 (B2)	1144
Rad + <i>E. coli</i> MalG <i>loop</i> (G)	1069
Rad + <i>S. aureus</i> MalD <i>loop</i> (D)	259

5.4 Testes ELISA e obtenção do título de anticorpos nos soros

Após realizada a metodologia de imunização das proteínas em camundongos C57BL/6, posterior sangria e obtenção do soro, foram realizados ensaios de ELISA indireto para investigação da imunogenicidade das proteínas e, por fim, obtenção do título. Ensaios iniciais foram realizados a partir da imobilização de 400 ng das proteínas diluídas em tampão carbonato pH 9.6. Os soros, obtidos a partir de sangria realizada após três imunizações, sofreram uma diluição de 1/25 em solução de bloqueio (leite 5% acrescido de albumina de soro bovino BSA a 0,5% em PBS-Tween). A resposta desses primeiros testes ELISA foi de baixa imunogenicidade para as proteínas, sendo necessárias duas imunizações adicionais, totalizando cinco imunizações em regime *prime boost*, seguidas de sangria e análise final dos títulos de IgGs nos diferentes soros.

Nas construções Rad *scaffold* + *loops* de *E. coli*, os resultados mostram uma reatividade considerável apenas nos soros B2 (animal imunizado com Rad + ModB *loop* 2) e G (animal imunizado com Rad+MalG *loop*), o que indica que as imunogenicidades distintas apresentadas são decorrentes dos *loops*, dado que a proteína *scaffold* é a mesma. Os resultados mostram ainda, que o soro contra C2 (Rad + BtuC *loop* 2) apresenta maior reatividade que a proteína Rad *scaffold*,

ao passo que o soro G foi o mais reativo dentre todos contra Rad+MalG *loop*. Esse foi escolhido como o mais promissor de *E. coli* para os ensaios posteriores.

O soro obtido a partir de animais imunizados com a proteína D, Rad+MalD *loop* de *S. aureus*, apresentou imunogenicidade alta e valores distintos de título quando em contato com Rad+MalD *loop* e Rad *scaffold*, o que mostra uma considerável população de IgGs reativas a MalD *loop*, sendo portanto promissora em próximos ensaios. O título de anticorpos em cada amostra de soro foi determinado quantitativamente por meio de diluição seriada (Tabela 3).

Tabela 3 - Título dos soros obtidos na sangria realizada após a quinta imunização dos animais. Títulos dos diferentes soros obtidos por meio de diluição seriada dos mesmos, colocados em contato com placas previamente sensibilizadas com 400 ng da proteína correspondente e posterior plotagem dos resultados. Foi considerado como *cut off* o valor de diluição correspondente ao dobro da absorbância (492 nm) obtida para o branco. Para cada amostra de soro foi obtido o título de anticorpos contra a proteína Rad *scaffold* sem *loop* e contra a proteína Rad+*loop* correspondente.

Soro: Proteína	Título
Anti-R : Rad <i>scaffold</i>	0.0
Anti-C1 : Rad <i>scaffold</i>	830.5
Anti-C1 : C1	836.0
Anti-C2 : Rad <i>scaffold</i>	330.0
Anti-C2 : C2	243.0
Anti-C3 : Rad <i>scaffold</i>	75.8
Anti-C3 : C3	425,0
Anti-B2 : Rad <i>scaffold</i>	1176,9
Anti-B2 : B2	1533,0
Anti-G : Rad <i>scaffold</i>	766.0
Anti-G : G	142694.7
Anti-D : Rad <i>scaffold</i>	360.4
Anti-D : D	70144.9

A imunogenicidade da proteína Rad sem *loop* inserido foi nula no soro anti-Rad obtido após a segunda sangria, o que é positivo para as nossas análises subsequentes, ao passo que as amostras são policlonais e apenas os anticorpos anti-*loops* serão reativos contra as permeases. Os componentes bacterianos com maior imunogenicidade reportados na literatura são usualmente as proteínas de membrana

externa (GARMORY; TITBALL, 2004). Por outro lado, os componentes de transportadores ABC, sobretudo proteínas periplasmáticas e de membrana interna, já foram identificados como estimuladores de produção de anticorpos, tanto em bactérias gram positivas como gram negativas (BURNIE et al., 2000; VYTVYTSKA et al., 2002), embora o mecanismo de apresentação das proteínas ao sistema imune durante a infecção seja pouco conhecido.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram uma considerável imunogenicidade para o soro anti-G: Rad+G *loop*, o soro com maior título dentre todas as amostras analisadas, o que nos permite concluir que o *loop* periplasmático de MalG modulou positivamente a resposta imune e será usado nos ensaios posteriores em altas diluições.

Os soros anti-B2 (Rad+B2 *loop*), anti-C1 (Rad+C1 *loop*) e anti-C2 (Rad+C2 *loop*) apresentaram títulos modestos em relação ao título de anti-G, e a diferença pouco significativa entre os títulos anti-Rad e anti-Rad+*loop*, no caso de anti-C2 e anti-C1, pode significar uma baixa imunogenicidade dos seus respectivos *loops*, o mesmo padrão foi observado para anti-B2. A obtenção dos diversos valores de título foi realizada por meio de plotagem dos valores de absorbância e respectivas equações de reta evidenciadas na Figura 17.

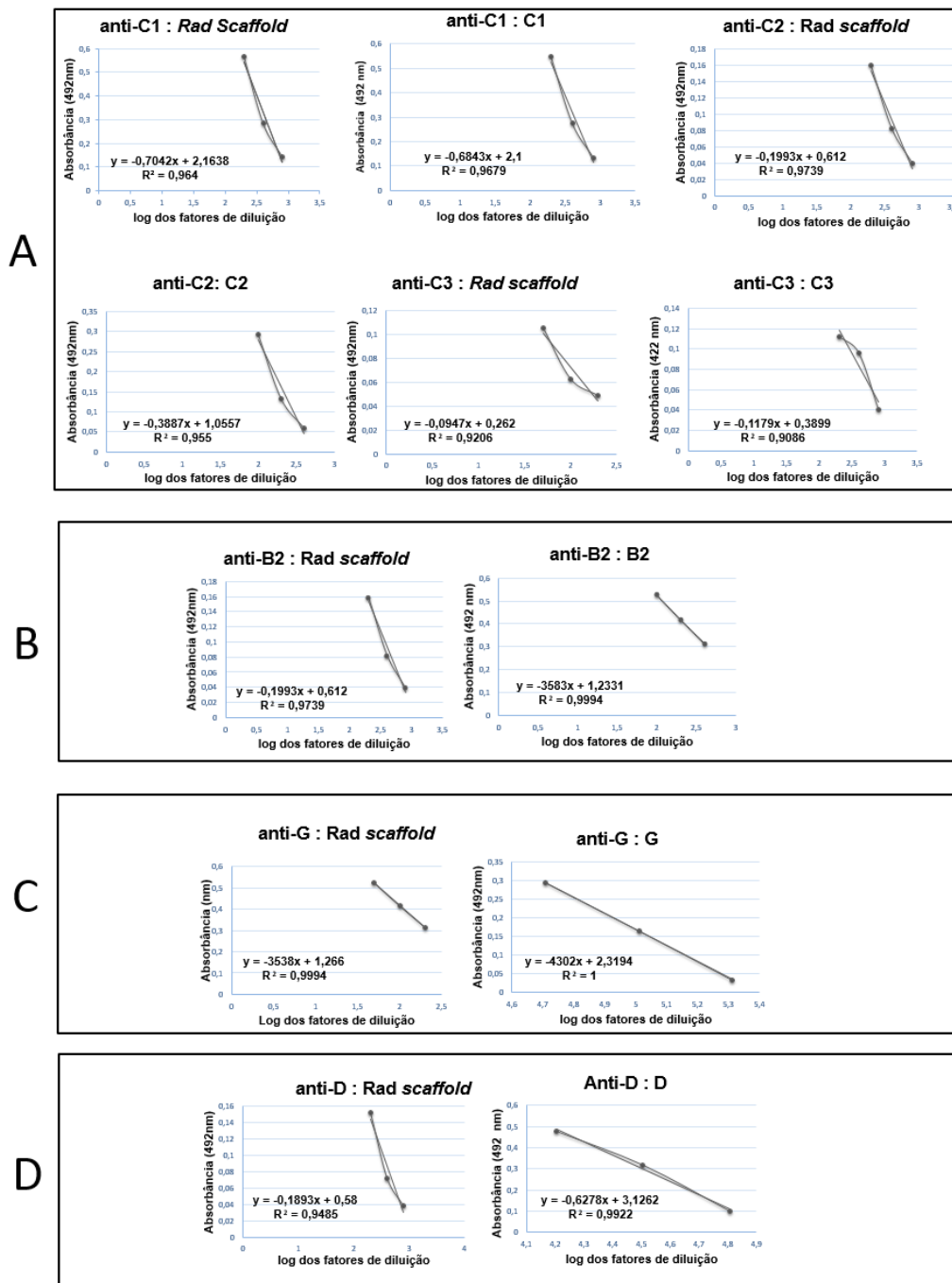


Figura 17 - Gráficos plotados para o cálculo dos títulos dos diferentes soros obtidos por ELISA indireto. Plotagem dos dados de absorbância (492 nm) x log dos fatores de diluição dos diferentes soros na etapa de leitura dos testes de ELISA, a equação de reta correspondente a cada gráfico foi utilizada para o cálculo dos títulos usando como *cutoff* o valor de correspondente ao dobro do valor do branco obtido em cada amostra. Para todas as amostras foi obtido título contra a proteína Rad vazia e contra Rad + loop correspondente. **A** Gráficos plotados para obtenção do título de anticorpos anti *E. coli* BtuC loops. **B** Gráficos plotados para obtenção do título de anticorpos anti *E. coli* ModB loop 2. **C** Gráficos plotados para obtenção do título de anticorpos anti *E. coli* MalG loop. **D** Gráficos plotados para obtenção do título de anticorpos anti *S. aureus* MalD loop.

O soro anti-D (Rad + D loop), o único obtido contra uma proteína Rad associada a um loop de *S. aureus*, teve imunogenicidade satisfatória (Figura 17): Os resultados mostraram título alto para a Rad

+ MalD *loop*, e um título baixo associado à proteína Rad *scaffold* vazia, o que permite, assim como MalG de *E. coli*, concluir que o *loop* periplasmático de MalD modulou positivamente a resposta imunológica.

5.5 Detecção das permeases selvagens de *E. coli* e *S. aureus* por meio dos diferentes anticorpos anti-Rad + *loop* em *Western Blot*

Com o objetivo de verificar se os anticorpos produzidos contra as proteínas quiméricas Rad+*loop* eram capazes de reconhecer as permeases selvagens presentes nas membranas plasmáticas de *E. coli* e *S. aureus*, amostras de lisados totais das duas bactérias, como também das proteínas Rad + *loops* correspondentes, foram submetidas a SDS-PAGE e, posteriormente, transferidas à membrana de PVDF. Após transferência e etapas de bloqueio, os anticorpos foram adicionados em diluições diferentes, de acordo com seus títulos (ANEXO 2).

Todas as amostras de anticorpos anti-Rad + *loop* da proteína BtuC (*loops* 1, 2 e 3) foram capazes de reconhecer lisados de *E. coli*, que contêm a permease BtuC (32.9 kDa) do transportador de vitamina B12 selvagem (Figura 18 A-C). O mesmo resultado foi encontrado para anti-Rad + *loop* de ModB e MalG, indicando reconhecimento dos anticorpos pelas permeases selvagens dos transportadores de molibdato ModB (24.9 kDa) e maltose MalG (32.9 kDa) de *E. coli* respectivamente (Figura 18 D e E).

O anticorpo anti-Rad + MalD *loop* de *S. aureus* (Anti-D) também foi capaz de reconhecer, por *Western Blot*, o lisado celular de *S. aureus* que contém o transportador de maltose e sua permease MalD (31.5 kDa) (Figura 19).

Apesar do reconhecimento dos anti-*loops* dos lisados de *E. coli* e *S. aureus*, a massa molecular das permeases selvagens não condiz com as bandas encontradas nas membranas de PVD. Possivelmente essa disparidade nas massas foi encontrada por conta de se tratar de lisados totais, sem procedimentos de extração de proteínas de membrana ou obtenção de permeases recombinantes puras, o que sugere que as proteínas podem apresentar *in vivo*, conformações diferentes.

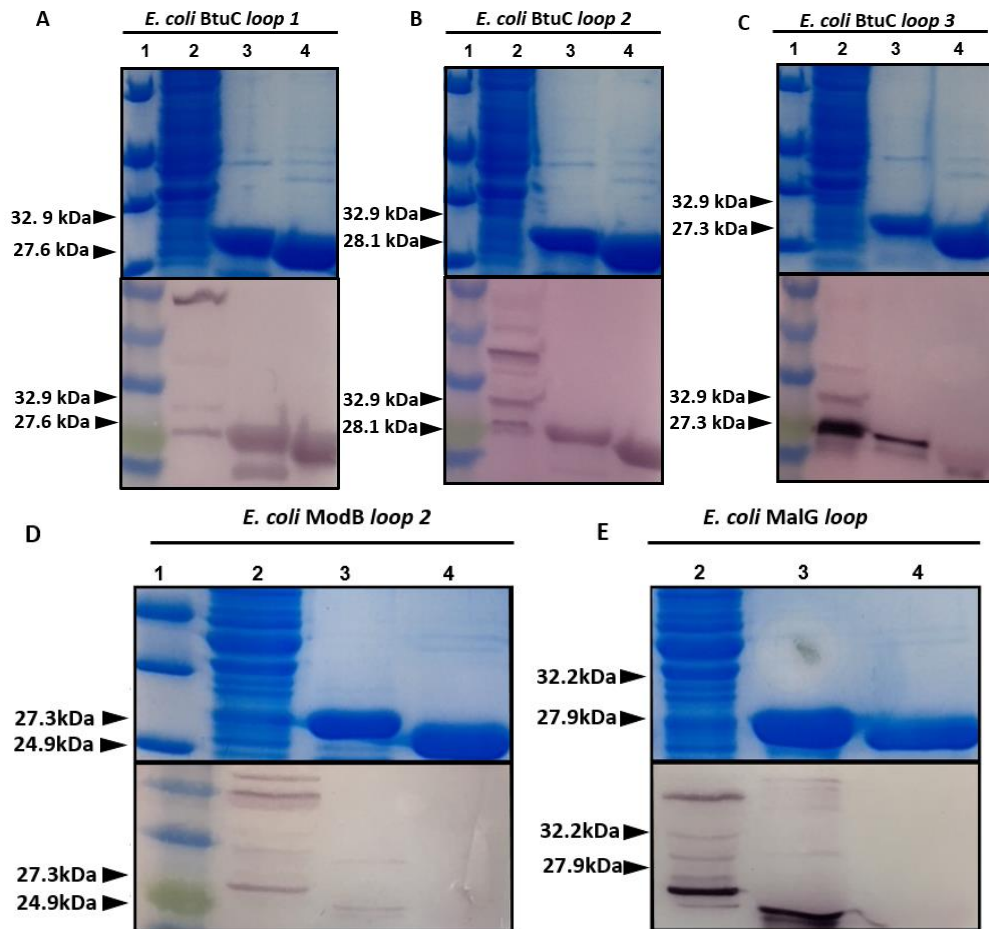


Figura 18 - Verificação do reconhecimento dos anticorpos anti-Rad + loop de *E. coli* por Western Blot. SDS-PAGE 12% seguida de membrana de PVD revelada por reação colorimétrica com NBC-BCIP, amostras foram adicionadas no mesmo esquema do gel de SDS-Page. 1. Marcador molecular 2. Lisado celular de *E. coli* 3. Proteína Rad + loop correspondente 4. Rad scaffold vazia. **A** BtuC loop 1. **B** BtuC loop 2. **C** BtuC loop 4. **D** ModB loop 2. **E** MalG loop.

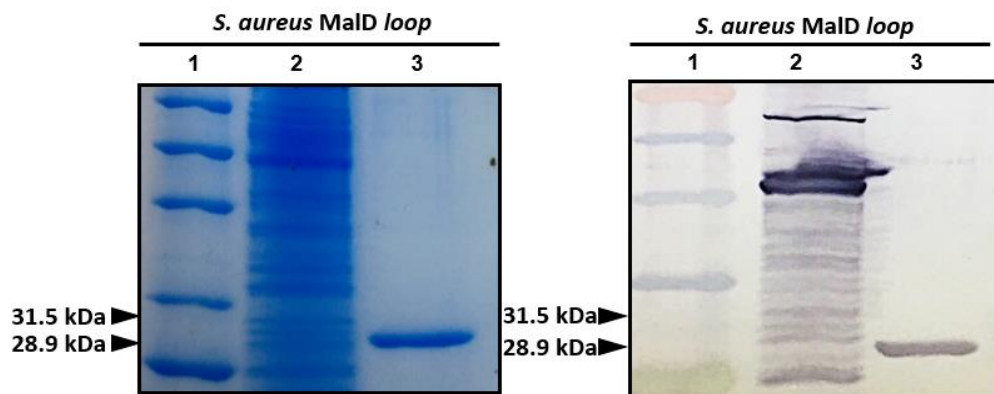


Figura 19 - Verificação do reconhecimento do anticorpo anti-Rad + MalD loop de *S. aureus* por Western Blot. SDS-PAGE 12% seguida de membrana de PVD revelada por reação colorimétrica com NBC-BCIP, amostras foram adicionadas no mesmo esquema do gel de SDS-Page. 1. Marcador molecular 2. Lisado celular de *S. aureus* 3. Proteína Rad + MalD loop.

Alguns anticorpos foram incapazes de reconhecer a proteína Rad scaffold pura na membrana de PVD, o que pode ser explicado pela alta

diluição de uso dos anticorpos primários no *Western Blotting* visando padronizar uma concentração de soro em que fosse reconhecida somente a região de *loop* alvo. Adicionalmente, as diferentes proteínas mostraram-se cada qual, individualmente, reativas ou não à proteína Rad *scaffold* vazia. Portanto, diluições individuais dos soros correspondentes para cada uma foram realizadas a fim de maximizar a população de IgGs reativas somente às regiões de *loop*.

Por fim, os resultados de *Western Blot* mostraram que todos os anticorpos foram capazes de reconhecer as proteínas purificadas e os lisados celulares, sugerindo que o mesmo poderia acontecer em células bacterianas vivas como investigado a seguir.

5.6 Investigação da capacidade dos anticorpos reconhecerem seus alvos por Elisa de célula inteira (*Whole cell Elisa*)

Para determinar se os diferentes anticorpos obtidos no soro de animais imunizados com Rad+*loop* eram capazes de reconhecer as alças extracelulares das proteínas expressas na membrana plasmática de *E. coli* e *S. aureus*, foi realizado o procedimento de ELISA de célula inteira (do inglês *Whole Cell Elisa*, WCE), uma robusta técnica para identificação de antígenos de superfície bacterianos (ELDER; BORAKER; FIVES-TAYLOR, 1982). O uso de WCE para identificação de importadores ABC por anticorpos já foi reportado no desenvolvimento de IgGs contra a proteína periplasmática ligadora de fosfato, PstS, do cognato importador de *Streptococcus mutans*. Nesse trabalho, o anticorpo não somente foi capaz de reconhecer a proteína no periplasma da bactéria gram positiva, como diminuiu a colonização das mesmas *in vivo* (FERREIRA et al., 2016).

No presente trabalho, células de *S. aureus* e *E. coli* foram coletadas após crescimento, lavadas em PBS e adsorvidas em placa de ELISA a 37°C por 18 horas. Posteriormente, realizou-se as etapas comuns ao ELISA convencional, tal como bloqueio, incubação com os diferentes anticorpos primários anti-Rad + *loops* e incubação com anticorpo secundário, seguida de leitura.

As amostras de *E. coli* anti-MalG *loop*, BtuC *loop* 2 e BtuC *loop* 3, assim como a amostra anti-MalD de *S. aureus*, apresentaram um valor de absorvância 492 nm acima do dobro do valor do branco, valor esse usado como *cutoff*. A Figura 20 mostra a relação de todas as absorvâncias obtidas pelas diferentes amostras no procedimento de WCE. O comportamento distinto dos anticorpos obtidos, em termos absolutos de absorvância medida a 492 nm, podem ser explicados inicialmente, por seus diferentes títulos, que são associados aos níveis de imunogenicidade conferida pelos *loops* em relação à proteína *Rad scaffold*. Adicionalmente, os diferentes transportadores não são expressos na mesma proporção nas células, o que pode influenciar no número de epítomos disponíveis para cada IgG direcionada a um transportador ABC específico e, conseqüentemente, em um valor único de absorvância para cada amostra.

O resultado se mostrou ainda surpreendente no caso das amostras de *E. coli*. Por se tratar de uma gram negativa, esperava-se que a membrana externa representasse uma barreira adicional para o reconhecimento dos anticorpos, se fazendo necessário investigações adicionais como por imunofluorescência, para comprovar esse resultado.

O presente resultado é o primeiro deste trabalho a apontar experimentalmente que anticorpos gerados por animais imunizados com proteínas Rad+*loops* portadoras de diferentes regiões das permeases reagem com células adsorvidas em placa, fortemente sugerindo que seus antígenos poderiam ser alcançados pelos mesmos *in vitro*.

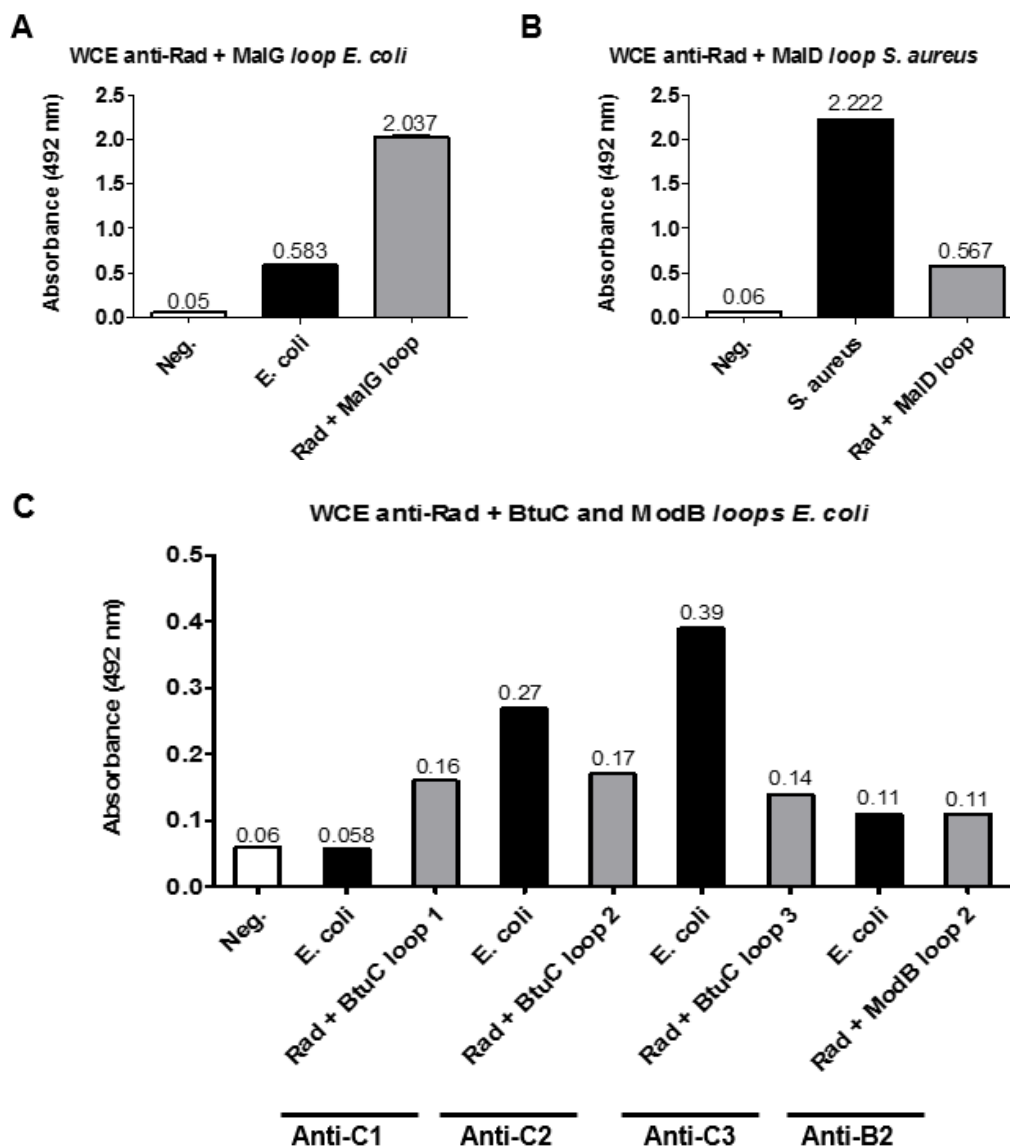


Figura 20 - Ensaio *Whole Cell Elisa* para atividade funcional de anticorpos anti-Rad + loops. **A** WCE com células de *E. coli* DH5 α e proteína Rad + MalG loop usadas como fase sólida e incubadas com anticorpos anti-Rad + MalG loop. **B** WCE com células de *S. aureus* subsp. *aureus* N315 e proteína Rad + MalD loop usadas como fase sólida e incubadas com anticorpos anti-Rad + MalG loop. **C** WCE com células de *E. coli* DH5 α e proteína Rad + BtuC loops 1, 2 e 3 e Rad + ModB loop 2 usadas como fase sólida e incubadas com anticorpos anti-Rad + BtuC loop 1, 2 e 3 e anti-Rad + ModB loop 2 correspondentes. Neg: Controle negativo sem adição de anticorpo primário. Os valores são mostrados em relação a absorvância (492nm) obtida na leitura das placas.

5.7 Investigação da capacidade dos anticorpos reconhecerem seus alvos por Imunofluorescência

Em associação aos resultados do WCE, foram realizados ensaios de imunofluorescência para confirmar a capacidade dos anticorpos reconhecerem seus respectivos alvos, ou as alças (*loops*) externos das permeases de transportadores ABC que naturalmente são embebidas

na membrana plasmática. No caso de *E. coli*, bactéria gram negativa, a membrana externa configura uma barreira adicional quando comparada a bactéria gram positiva *S. aureus*. Entretanto, as bactérias gram positivas contêm uma parede de peptidoglicanos mais densa do que *E. coli*, que poderia, igualmente, ser um impedimento para o reconhecimento dos alvos pelos anticorpos. Adicionalmente, nas bactérias gram positivas as SBPs são ancoradas na membrana, muito próximas às permeases, o que pode diminuir a exposição da região de interação entre o anticorpo e o seu epítipo.

Para minimizar esses efeitos no reconhecimento de anticorpos, etapas complementares ao procedimento padrão de imunofluorescência são comumente usadas para permeabilizar as células. Como exemplo, temos a fixação com metanol como uma alternativa ao PFA ou o tratamento com diversos detergentes, como Triton X-100 e saponina, sendo o último uma alternativa mais branda de permeabilização (SCHEFFLER; SCHIEFERMEIER; HUBER, 2014).

Neste trabalho, células de *E. coli* foram fixadas com PFA e submetidas à imunofluorescência sendo ou não submetidas às etapas de permeabilização por saponina. Ao final dos ensaios, foi analisada a presença do anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluoróforo Alexa 488. A fixação das células de *E. coli* com PFA se mostrou eficaz, assim como a marcação dos ácidos nucleicos pelo reativo Hoechst (Figura 21A).

Foi obtida fluorescência também quando utilizado como controle o anticorpo anti-GroEL, uma vez que GroEL é uma importante chaperona de *E. coli* e, portanto, só acessível aos anticorpos quando os mesmos são capazes de atravessar a membrana celular (HENDERSON; FARES; LUND, 2013; MORAES et al., 2015). A fluorescência associada à anti-GroEL foi utilizada como controle positivo (Figura 21B).

E. coli quando submetida à etapa de permeabilização com saponina 1%, apresentou fluorescência quando em contato com anti-Rad + MalG loop (Figura 20C). Porém, o mesmo não foi obtido quando saponina estava ausente nas etapas de bloqueio e incubação com os anticorpos, o que indica a ineficiência dos anticorpos em atravessarem

a barreira imposta pela membrana externa de *E. coli* (Figura 21D).

O presente resultado também permite concluir que o resultado obtido no ensaio de WCE só foi possível pela permeabilização da membrana, demonstrando a incapacidade dos anticorpos de atravessarem a membrana externa de *E. coli* como retratado no ensaio do WCE (Figura 20A). Resumidamente, esses resultados mostram que o reconhecimento dos alvos pelos anticorpos específicos é possível, porém, *apenas* em células permeabilizadas.

Da mesma forma que mostrado para *E. coli*, células de *S. aureus*, se mostraram eficientemente fixadas na placa de imunofluorescência com PFA (Figura 22).

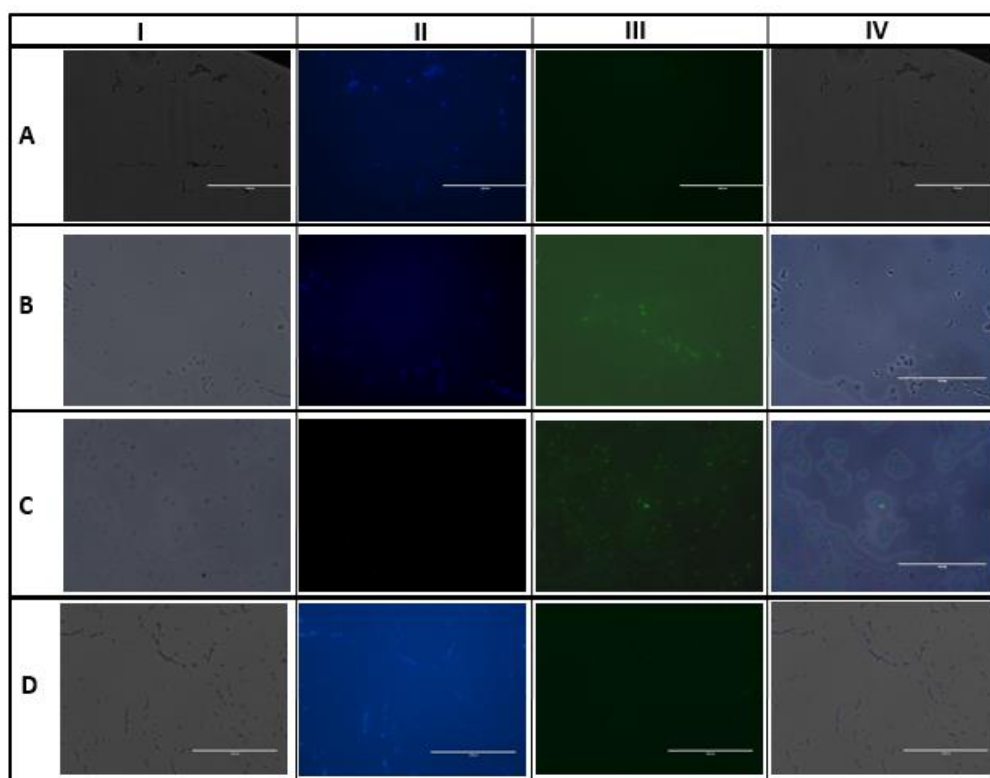


Figura 21 - Ensaio de imunofluorescência para reconhecimento do transportador de maltose de *E. coli* pelo anticorpo anti-Rad+MalG *loop* na ausência de etapas de permeabilização com saponina. I Luz branca sem emissão de fluorescência. II Canal de emissão de fluorescência do marcador de ácido nucléico Hoechst. III Canal de emissão de fluorescência de Alexa 488. IV Sobreposição dos dois últimos canais de emissão. A Controle negativo ausente de incubação com anticorpo primário anti-Rad MalG *loop*. B Tratamento com anti-GroEL como anticorpo primário. C Incubação com anti-Rad MalG *loop* em presença de saponina 1% nas etapas de bloqueio e incubação com anticorpos primário e secundário. D Incubação com anti-Rad MalG *loop* em ausência de permeabilização por detergente.

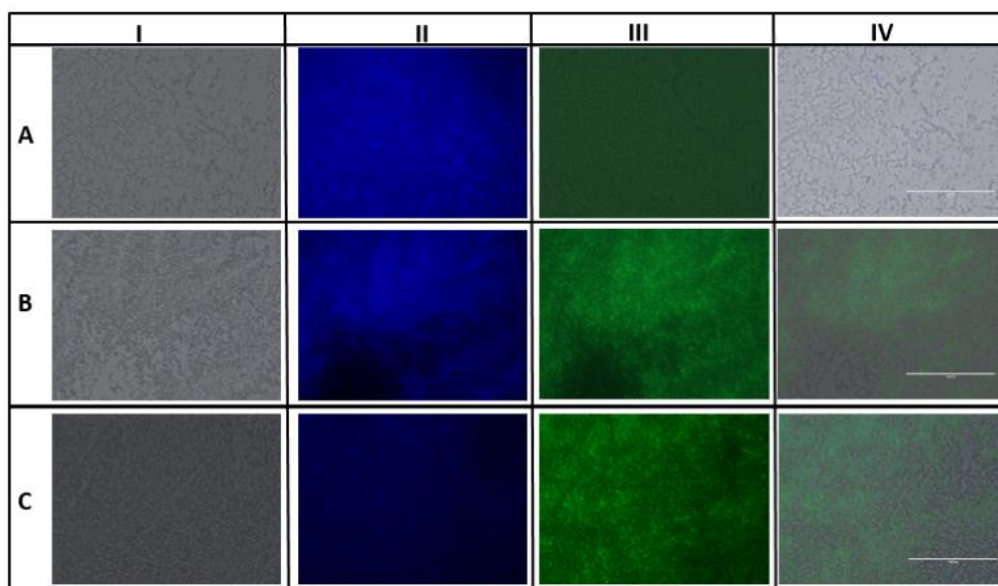


Figura 22 - Ensaio de imunofluorescência para reconhecimento do transportador de maltose de *S. aureus* pelo anticorpo anti-Rad MalD *loop* na ausência de etapas de permeabilização com saponina I Luz branca sem emissão de fluorescência. II Canal de emissão de fluorescência do marcador de ácido nucléico Hoechst. III Canal de emissão de fluorescência de Alexa 488. IV Sobreposição dos dois últimos canais de emissão. **A** Controle negativo ausente de incubação com anticorpo primário anti-Rad MalD *loop*. **B** Incubação com anti-Rad MalD *loop* em presença de saponina 1% nas etapas de bloqueio e incubação com anticorpos primário e secundário. **C** Incubação com anti-Rad MalD *loop* em ausência de permeabilização por detergente.

As células de *S. aureus* foram submetidas aos mesmos procedimentos de *E. coli*, na presença e ausência de saponina nas etapas de bloqueio e incubação com anticorpos anti-Rad MalD *loop* e anti-IgG complexado a Alexa 488. Interessantemente, tanto em presença como ausência de permeabilização, a fluorescência foi detectada (Figura 22 B e C). Esse resultado permite assumir que apesar da densa camada de peptídeoglicano presente no envoltório de microrganismos gram positivos como *S. aureus*, os anticorpos são capazes de reconhecer as permeases presentes na membrana plasmática, mesmo sem o auxílio de permeabilizantes.

5.8 Avaliação do crescimento bacteriano em meio mínimo na presença de anticorpos anti-Rad *loop*.

Após avaliar a habilidade de anticorpos produzidos contra regiões externas de permeases de transportadores ABC reconhecerem seus respectivos epítomos em células inteiras, decidiu-se por utilizar o gram

positivo *S. aureus* para ensaios de inibição do seu transportador de maltose *in vivo*, durante crescimento celular.

O anticorpo anti-Rad + MalD *loop* foi selecionado para testes de inibição por ter sido o único com comprovada interação com seu epítopo MalD nos três ensaios anteriores: *Western Blot*, WCE e imunofluorescência. Nesse caso, comprovamos que os anticorpos interagem com o transportador mesmo em células inteiras. Adicionalmente o alto título dos anticorpos, decorrente da imugenicidade da região alvo, permitiu ensaios com diluições do anticorpo em meio de cultura.

Anti-Rad MalD *loop* foi adicionado à cultura de *S. aureus* crescendo em meio mínimo nutricional M9 com maltose como única fonte de carbono, tornando o funcionamento do transportador em questão vital para o crescimento. Nesse ensaio esperava-se que o impedimento estérico do transportador por meio de ligação do anti-Rad MalD *loop* na região de poro das permeases fosse capaz de inibir ou diminuir o crescimento bacteriano.

Apesar do alto título do anticorpo em questão (70.144), quando adicionado ao meio de cultura de *S. aureus* crescidas até uma DO de 0.3 em diluição 1:10.000, não exerceu grande influência no número de CFUs contabilizadas de amostras retiradas 240 minutos após o tratamento, em comparação ao número de CFUs obtidas quando soro controle (*mock*), isento de IgGs, foi adicionado.

Entretanto, após 60 minutos de tratamento houve um menor aumento no número de CFUs, de $16,4 \times 10^6$ para $17,0 \times 10^6$ no meio contendo anticorpos anti-Rad MalD *loop* quando comparado ao salto de 16.4 para $17,6 \times 10^6$ quando adicionado soro controle. O meio contendo anti-Rad MalD *loop* continuou apresentando valor inferior de número de CFUs do que comparado ao controle após 120 minutos (Figura 23 A e B). Esses resultados mostram que há uma diferença de crescimento observado para as duas culturas sugerindo a efetividade de inibição de transportador mediada pelos anticorpos.

Quando anti-Rad MalD *loop* e soro controle foram adicionadas às culturas em maior concentração, como ilustrado para diluição de 1:5.000,

o crescimento das bactérias é mais acentuado em relação à adição dos anticorpos em diluição maior, para ambos os casos (Figura 23A). A Figura 23D mostra a relação de valores absolutos do número de CFUs contabilizadas para todas as amostras nos diferentes tempos de coleta.

A influência positiva dos soros com diluição 1:5.000 no crescimento bacteriano de *S. aureus* possivelmente se deve ao aumento da concentração nutricional do meio quando os mesmos são adicionados em maior quantidade, pela possível presença de açúcares e outros nutrientes no meio em que as IgGs estão presentes derivado de material sanguíneo murino.

Contudo, o resultado para os tempos de 60 e 120 minutos das amostras recipientes de ambos os soros anti-Rad MalD *loop* e controle negativo em diluição 1:10.000 pode significar, de fato, uma perturbação causada pelos anticorpos no transporte de maltose nestes meios. Se faz necessária porém, uma maior investigação para comprovar se os transportadores de maltose foram inibidos pelos anticorpos anti-Rad MalD *loop*.

A expressão de MalD recombinante por inteiro seguida de *Western Blot* ou ensaios de *pull down* poderia inicialmente provar a interação dos anticorpos com a proteína. Em seguida, poderia ser monitorado, em paralelo, o crescimento de cepa selvagem e mutante de *S. aureus* com deleção no gene Δ *malD* nas mesmas condições de crescimento: Em meio mínimo M9 suplementado por maltose como única fonte de carbono na presença e ausência dos anticorpos.

Pouco se sabe sobre a importação de maltodextrinas em *S. aureus* e portanto não se pode descartar a hipótese de que a bactéria poderia estimular a produção de outros transportadores para a importação de açúcar. A perda energética advinda da produção de transportadores ABC de maltose adicionais ou outros não descritos poderia ser a causa de diminuição na taxa de crescimento, o que significaria que, indiretamente, os anticorpos são capazes de influenciar na taxa de divisão celular.

Adicionalmente, a relação do número de transportadores por bactéria pode ser muito superior ao número de IgGs adicionadas ao meio

de cultura, o que poderia dificultar a obtenção de uma diminuição drástica no crescimento bacteriano oriunda do impedimento estérico causado por anticorpos ligados ao poro dos ABCs. Finalmente, por *S. aureus* se tratar de uma bactéria gram positiva, não se sabe se o fato de suas SBPs estarem ligadas em região próxima ao poro do ABC pôde dificultar a interação dos anticorpos com seus epítopos em células em crescimento constante, e não fixadas como nos ensaios de WCE e imunofluorescência.

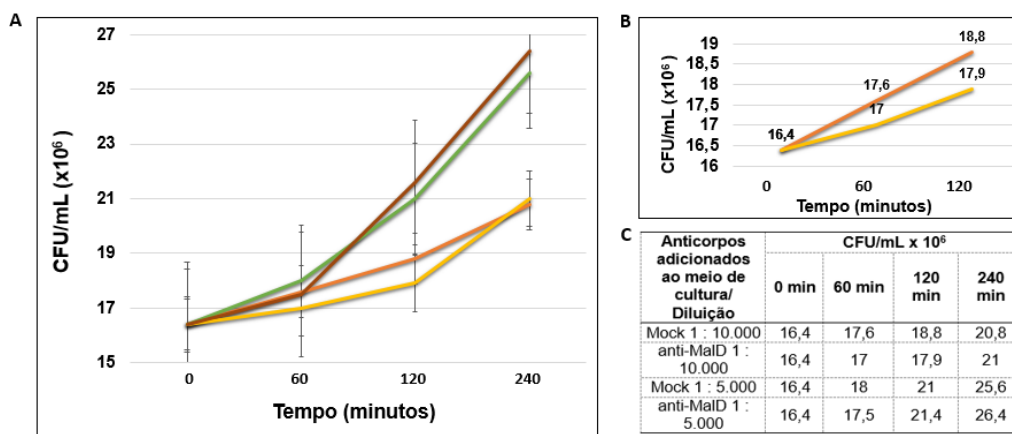


Figura 23 - Investigação da inibição de transportador de maltose de *S. aureus* mediada por anti-Rad loop. **A** Relação de CFUs/L ($\times 10^6$) obtidas nos diferentes tempos em que amostras foram retiradas da cultura, sendo tempo 0 o momento em que os anticorpos foram adicionados. Amarelo: anti-Rad MalD loop 1:10.000; laranja: Controle negativo (Mock) 1:10.000; vermelho: anti-Rad MalD loop 1:5.000; verde: Controle negativo (Mock) 1:5.000. **B** representação gráfica apenas dos três primeiros pontos das curvas de anti-Rad MalD loop 1:10.000; e controle negativo (Mock) acompanhados dos valores absolutos de CFUs nesses intervalos. **C** relação de valores absolutos do número de CFUs/mL ($\times 10^6$) contabilizadas para todas as amostras nos diferentes tempos de coleta. Experimento realizado em duplicata.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de vacinas utilizando os transportadores ABC do tipo importadores tem, especificamente, focado nas SBPs como os alvos primários (TANAKA et al., 2018). Estudos envolvendo SBPs de diversos organismos como *Yersinia pestis* (TANABE et al., 2006), *Moraxella catarrhalis* (YANG; JOHNSON; MURPHY, 2011), *S. aureus* (YANG et al., 2016) dentre outros, mostram alta imogenicidade das mesmas, além de conferirem proteção quando usadas em imunizações *in vivo*. Todavia, o uso de alvos alternativos às proteínas periplasmáticas, como as permeases, é pouco explorado para essa finalidade, principalmente devido à difícil obtenção dessas proteínas

para estudos, por se tratarem de proteínas de membrana, e também, por sua imunogenicidade questionável.

Apesar de não serem complexos proteicos presentes na superfície celular, componentes de transportadores ABC têm sido apresentados com alta imunogenicidade. A ATPase do transportador ABC que apresenta alta homologia com o exportador YkpA de *Bacillus subtilis* tem sido descrita como a proteína mais imunogênica em soros de pacientes acometidos por sepse devido à infecção de cepas de *S. aureus* resistente à meticiclina EMRSA-15. Anticorpos direcionando especificamente aos epítomos dessa ATPase quando utilizados em modelo murino de infecção resultaram, inclusive, em decaimento logarítmico no número de CFUs contabilizadas para colonização do baço, fígado e rim dos animais (BURNIE et al., 2000).

Em outro estudo, soro colhido de coelhos infectados com *Y. pestis* mostrou reatividade contra a proteína SBP do importador de oligopeptídeos OppA, evidenciando a imunogenicidade dessa proteína. Em estudos em camundongos infectados com *Y. pestis* previamente imunizados com anticorpos anti-OppA recombinante houve um aumento da sobrevivência dos animais em teste de desafio sendo proposto que o bloqueio da SBP inviabilizou o ABC e comprometeu a patogênese (TANABE et al., 2006).

Neste trabalho, mostramos uma eficiente alternativa para a expressão das proteínas de membrana completas, que foi o uso da técnica *RAD display* (ROSSMANN et al., 2017). Essa metodologia possibilita a fácil produção de epítomos para obtenção de anticorpos contra regiões específicas de proteínas, com sucesso. Outro ponto interessante que vale a pena ressaltar, é a baixa imunogenicidade apresentada pela proteína *Rad Scaffold*, permitindo que as respostas sejam essencialmente decorrentes da presença de epítomos

As análises de bioinformática se mostraram muito eficazes na escolha dos *loops* alvo, uma vez que os mesmos puderam ser reconhecidos posteriormente pelos anticorpos em ensaios de *Western Blot*, WCE e imunofluorescência na maior parte dos casos. Adicionalmente, os resultados de imunofluorescência foram

determinantes, ao passo que mostraram experimentalmente serem mais eficientes e confiáveis para demonstrar a formação do complexo anticorpo-epítipo em células não lisadas do que os obtidos nos ensaios de WCE.

Diferentemente do que foi reportado no estudo de Yang, Johnson e Murphy (2011) em que a SBP periplasmática do transportador de peptídeos OppA do gram negativo *M. catarrhalis* foi anotada como acessível aos anticorpos por meio de WCE, o presente trabalho mostra, por meio dos resultados de imunofluorescência, que a membrana externa foi, de fato, uma barreira eficaz para minar a chegada do anticorpo ao seu alvo. A ligação dos anticorpos aos respectivos epítopos só foi possível em *E. coli* quando auxiliada pelo uso de detergente que permeabilizou a membrana, demonstrando a ineficiência funcional de anticorpos produzidos contra regiões periplasmáticas de permeases de microrganismos gram negativos tendo esse organismo como modelo.

Durante o crescimento da bactéria gram positiva *S. aureus* em meio mínimo suplementado somente com maltose como fonte de carbono, em contato com anticorpos direcionados contra a região periplasmática das permeases do transportador ABC responsável pela importação desse açúcar, notou-se uma diferença discreta no crescimento bacteriano em meio em que os anticorpos foram inoculados. Essa diferença reflete o número de CFUs contabilizados em curto prazo. Esse resultado sugere fortemente que os anticorpos sejam os responsáveis pela diminuição no número de CFUs, provavelmente, como esperado, por meio do impedimento estérico ao importação de açúcar. Por outro lado, evidenciamos que o título dos anticorpos provavelmente não acompanha a velocidade com que as células se propagam.

Curiosamente, em estudo semelhante utilizando anticorpos produzidos contra as SBPs PiaA e PiuA do transportador de ferro de *Streptococcus. pneumoniae*, que mostraram proteção *in vivo* contra a infecção desse patógeno (BROWN et al., 2001), demonstrou-se que os anticorpos não foram capazes de afetar o crescimento da bactéria *in vitro*, em meio mínimo em restrição de ferro. O mecanismo de proteção

reportado *in vivo* é a opsonofagocitose mediada pelas IgGs anti-PiuA e anti-PiaA (JOMAA et al., 2005). A opsofagocitose também é apontada como o mecanismo de ação de anticorpos contra a SBP MntC do importador de manganês de *S. aureus* em ensaios *in vivo* (YANG et al., 2016).

MntC já foi usada em combinação com outras proteínas na vacina multi-antigênica SA4Ag contra *S. aureus*, que obteve sucesso em ensaios clínicos de fase 1 e 2. A vacina se mostrou-se segura para manipulação e indutora de produção de resposta imune eficaz em indivíduos sadios adultos, sobretudo por meio dos efeitos opsofagocíticos dos anticorpos (BEGIER et al., 2017). Atualmente, um ensaio de fase 2B vem sendo conduzido para analisar a eficiência dessa vacina no combate ao *S. aureus*, com fim previsto para agosto de 2019 (Clinicaltrials.gov: NCT02388165).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a estratégia é promissora, porém, se faz necessária, a investigação da influência de anticorpos direcionados contra as permeases no crescimento bacteriano usando outros elementos de transportadores ABCs como alvo, em novos testes *in vitro*, além de realizar ensaios que analisem o papel da opsofagocitose como método de combate ao patógeno *in vivo*. Adicionalmente, devemos ressaltar que talvez a estratégia seja mais eficiente quando voltada para transportadores essenciais, cuja inativação sejam realmente um problema para o crescimento, o que não foi abordado neste trabalho.

Neste sentido, o trabalho abre diversas possibilidades interessantes para utilização da técnica *RAD display* para exposição de permeases ou outros alvos como epítomos para inibição de transportadores ABC. Futuros trabalhos utilizando *S. aureus* ou outros patógenos de interesse, tendo como alvo importadores essenciais, ou ainda exportadores especificamente relacionados ao fenômeno de MDR como Sav1866, trarão importantes perspectivas para a eficácia da técnica testada. Esse é um ponto importante a ser ressaltado, uma vez que não conseguimos a produção da Rad + Sav1866 *loop*. Possivelmente as características da região escolhida afetaram de forma

drástica o enovelamento da proteína Rad. Novas construções usando diferentes construções devem ser testadas para a obtenção de regiões desse transportador.

Apesar de não termos evidenciado respostas significativas em relação à inibição, os resultados são promissores e abrem perspectivas para a inibição desses importantes complexos proteicos. Usamos uma abordagem de expressão de epítopos de proteínas de membrana que pode ser aplicada a qualquer proteína desse tipo, com alta eficiência, e adicionalmente, mostramos que a abordagem é mais efetiva em relação à bactérias gram positivas. O uso de diferentes estratégias para apresentação dos anticorpos é também possível, entre outras como o uso de aptâmeros, de nanopátulas, entre outras. Adicionalmente, o projeto levanta a possibilidade de uso de inibidores contra diferentes transportadores ou proteínas de membrana que tenham relevância no tratamento de doenças, especificamente o câncer, onde transportadores ABC têm um papel fundamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A. S. et al. *Staphylococcus aureus* Manganese Transport Protein C Is a Highly Conserved Cell Surface Protein That Elicits Protective Immunity against *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of infectious diseases**, v. 205 n. 11, p. 1688-1696, 2012.

AHUJA, S. et al. Structural analysis of bacterial ABC transporter inhibition by an antibody fragment. **Structure**, v. 23 n. 4, p. 713–723, 2015.

ALAM, A. et al. Structure of a zosuquidar and UIC2-bound human-mouse chimeric ABCB1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115 n. 9, p.1973-1982, 2018.

ALLIGNET, J., SOLH, E. Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. **Gene**, v. 202, p. 133–138, 1997.

ASLANIDIS, C., DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18 n. 20, p. 6069–6074, 1990.

AUSTERMUHLE, M. I. et al. Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279 n. 27, p. 28243–28250, 2004.

BEGIER, E. et al. SA4Ag, a 4-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine, rapidly induces high levels of bacteria-killing antibodies. **Vaccine**, v. 35 n. 8, p. 1132-1139, 2017.

BIRKELAND, N. K. et al. Complete genome sequence analysis of *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324 (DSM 8774), a hyperthermophilic archaeal sulfate reducer from a North Sea oil field. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12 n. 1, p. 1–9, 2017.

BÖHM, A., et al. Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of *Escherichia coli*: Implications for mal gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277 n. 5, p. 3708–3717, 2002.

BOOS, W., SHUMAN, H. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62 n. 1, p. 204–229, 1998.

BORTHS, E. L., et al. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99 n. 26, p. 16642–16647, 2002.

BORTHS, E. L. et al. In vitro functional characterization of BtuCD-F, the

Escherichia coli ABC transporter for vitamin B12 uptake. **Biochemistry**, v. 44 n. 49, p. 16301–16309, 2005.

BROWN, J. S. et al. Immunization with Components of Two Iron Uptake ABC Transporters Protects Mice against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection. **Infection and immunity**, v. 69 n. 11, p. 6702–6706, 2001.

BURKE, K. A., LASCELLES, J. Nitrate Reductase System in *Staphylococcus aureus* Wild Type and Mutants. **Journal of bacteriology**, v. 123 n. 1, p. 308–316, 1975.

BURNIE, J. P. et al. Identification of an Immunodominant ABC Transporter in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Infection and Immunity**, v. 68 n. 6, p. 3200–3209, 2000.

BUTTON, D. K. et al. Carbohydrate transport in *Staphylococcus aureus*, maltose accumulation and metabolism. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 52 n. 3, p. 850–855, 1973.

CHANG, D. et al. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101 n. 19, p. 7427–32, 2004.

CHAPON, C., KOLB, A. Action of CAP on the *malT* promoter *in vitro*. **Journal of Bacteriology**, v. 156 n. 3, p. 1135–1143, 1983.

CHEN, J. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23 n. 4, p. 492–498, 2013.

CHEN, J. et al. Trapping the Transition State of an ATP-Binding Cassette Transporter: Evidence for a Concerted Mechanism of Maltose Transport Trapping the transition state cassette transporter: Evidenc mechanism of maltose transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98 n. 13, p. 1525–1530, 2001.

COULTER, S. N. et al. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. **Molecular microbiology**, v. 30 n. 2, p. 393–404, 1998.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1323, 1999.

DAUS, M. L., GROTE, M., SCHNEIDER, E. The MalF P2 loop of the ATP-binding cassette transporter MalFGK2 from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium interacts with maltose binding protein (MalE) throughout the catalytic cycle. **Journal of Bacteriology**, v. 191 n. 3, p. 754–761, 2009.

DAVIDSON, A. L. Structural biology: Not just another ABC transporter. **Science**, v. 296 n. 5570, p. 1038–1040, 2002.

DAVIDSON, A. L. et al. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72 n. 2, p. 317–364, 2008.

DAVIDSON, A. L., SHUMAN, H. A., NIKAIDO, H. Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89 n. 6, p. 2360–2364, 1992.

DAWSON, R. J. P., LOCHER, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, p. 180-185, 2006.

DAWSON, R. J. P., LOCHER, K. P. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP, **Febs Letters** v. 581, n. 5, p. 935–938, 2007.

DEAN, D. A. et al. Interaction between maltose-binding protein and the membrane-associated maltose transporter complex in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 6 n. 15, p. 2033–2040, 1992.

DEAN, D. A. et al. Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265 n. 34, p. 21005–21010, 1990.

DELGADO, M. J. et al. Functional characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* modA and modB genes involved in molybdenum transport. **Microbiology**, v. 152 n. 1, p. 199–207, 2006.

DIPPEL, R., BOOS, W. The Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Metabolism and Transport. **Journal of Bacteriology**, v. 187 n. 24, p. 8322–8331, 2005.

DUNLAP; MADIGAN; MARTINKO. Microbiologia de Brock . 12^a Ed. Editora: Artmed. 2010

ELDER, B. L., BORAKER, D. K. FIVES-TAYLOR, P. M. Whole-Bacterial Cell Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Streptococcus sanguis* Fimbrial Antigens. **Journal of clinical microbiology**, v. 16 n. 1, p. 141-144, 1982.

EMBL-EBI, Clustal W. Disponível em: < <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> >. Acesso em: Maio de 2017.

FERREIRA, E. L. et al. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*. **Molecular oral microbiology**, v. 31 n. 5, p. 410–422, 2016.

FREY, B. et al. New function of vitamin B12: Cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of bacteriology**, v. 170 n. 5, p. 2078–2082, 1988.

FRIEDRICH, M. J., DEVEAUX, L. C., KADNER, R. J. Nucleotide sequence of the *btuCED* genes involved in vitamin B12 transport in *Escherichia coli* and homology with components of periplasmic-binding-protein-dependent transport systems. **Journal of Bacteriology**, v. 167 n. 3, p. 928–934, 1986.

GARMORY, H. S., TITBALL, R. W. ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. **Infection and immunity**, v. 72 n. 12, p. 6757–6763, 2004.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **The proteomics protocols handbook**, ed. John M. Walker, p. 571-607, 2005.

GERBER, S. et al. Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. **Science**, v. 321 n. 5886, p. 246–250, 2008.

GRAF, A. et al. The Hidden lipoproteome of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308 n. 6, p. 569-581, 2018.

GRIM, K. P. et al. The metallophore staphylopin enables *Staphylococcus aureus* to compete with the host for zinc and overcome nutritional immunity. **mBio**, v. 8 n. 5, p. 1–16, 2017.

GRUNDEN, A. M. et al. Repression of the *Escherichia coli* modABCD (molybdate transport) operon by ModE. **Journal of Bacteriology**, v. 178 n. 3, p. 735–744, 1996.

HARRO, C. et al. Safety and Immunogenicity of a Novel *Staphylococcus aureus* Vaccine: Results from the First Study of the Vaccine Dose Range in Humans **Clinical and vaccine immunology**, v. 17 n.12, p. 1868–1874 2010.

HENDERSON, B., FARES, M. A., LUND, P. A. Chaperonin 60: A paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple monl

ightingfunctions. **Biological reviews of the Cambridge philosophical society**, v. 88 n. 4, p. 955-987, 2013.

HOLLENSTEIN, K., FREI, D. C., LOCHER, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**, v. 446 n. 7132, p. 213–216, 2007.

HVORUP, R. N. et al. Asymmetry in the Structure of the ABC Transporter-Binding Protein Complex BtuCD-BtuF. **Science**, v. 317 n. 5843, p. 1387–1390, 2007.

JACKSON, S. M. et al . Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25 n. 4, p. 333-340, 2018.

JOMAA, M. et al. Antibodies to the Iron Uptake ABC Transporter Lipoproteins PiaA and PiuA Promote Opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 73 n.10, p. 6852-6859, 2005.

JONES, A., TURNER, J. M. Microbial metabolism of amino alcohols via aldehydes. **Journal of General Microbiology**, v. 67 n. 3, p. 379–381, 1971. <https://doi.org/10.1099/00221287-67-3-379>

JONES, S. A. et al. Glycogen and maltose utilization by *Escherichia coli* O157:H7 in the mouse intestine. **Infection and Immunity**, v. 76 n. 6, p. 2531–2540, 2008.

KELLIHER, J. L. et al. Acquisition of the Phosphate Transporter NptA Enhances *Staphylococcus aureus* Pathogenesis by Improving Phosphate Uptake in Divergent Environments, **Infection and immunity**, v. 86 n. 1, p. 1–14, 2018.

KHARE, D. et al. Alternating Access in Maltose Transporter Mediated by Rigid-Body Rotations. **Molecular Cell**, v. 33 n. 4, p. 528–536, 2009.

KLEIN, J. S., LEWINSON, O. Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. **Metalomics**, v. 3 n. 11, p. 1098-1108, 2011.

KLUYTMANS, J., VAN BELKUM A. VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. **Clinical microbiology reviews**, v. 10 n. 3, p. 505–520, 1997.

KORKHOV, V. M., MIREKU, S. A., LOCHER, K. P. Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD–F. **Nature**, v. 490 n. 7420, p. 367–372, 2012.

KUHNAU, S. et al. The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. **Journal of Bacteriology**, v. 173 n. 7, 2180–2186, 1991.

LAU, Y. H., et al. Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides. **Chemical Science**, v. 5, p. 1804-1809, 2014.

LEE, J. H., WENDT, J. C., SHANMUGAM, K. T. Identification of a new gene, molR, essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.172 n. 4, p. 2079–2087, 1990.

LEPRI, S. et al. Indole based weapons to fight antibiotic resistance : A structure-activity relationship study. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59 n. 3, p. 867-891, 2016.

LIEBEKE, M. et al. A metabolomics and proteomics study of the adaptation of *Staphylococcus aureus* to glucose starvation. **Molecular bioSystems**, v. 7 n. 4, p. 1241–1253, 2011.

LINDBLOW-KULL, C., KULL, F. J., SHRIFT, A. Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 163 n. 3, p. 1267–1269, 1995.

LIU, C. E., LIU, P. Q., AMES, G. F. L. Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC transporter). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272 n. 35, p. 21883–21891, 1997.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14 n. 4, p. 426–431, 2004.

LOMOVSKAYA, O., LEWIS, K. I. M. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89 n. 19, p. 8938-8942, 1992.

LOPEZ, C. G., BASTIDAS, M., DUBOURDIEU, M. Molybdenum uptake in *Escherichia coli* K12. **Journal of General Microbiology**, v. 139 n. 8, p. 1869–1875, 1993.

LUBELSKI, J., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71 n. 3, p. 463–476, 2007.

LUNDRIGAN, M. D., KADNER, R. J. Altered cobalamin metabolism in *Escherichia coli* btuR mutants affects btuB gene regulation. **Journal of**

Bacteriology, v. 171 n. 1, p. 154–161, 1998.

MARSH, M. E. et al. ATP half-sites in RadA and RAD51 recombinases bind nucleotides. **FEBS Open Bio**, v. 6. n. 5, p. 372–385, 2016.

MATTHYSSE, A. G., YARNALL, H. A., YOUNG, N. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 178 n. 17, p. 5302–5308, 1996.

MAUPIN-FURLOW, J. A. et al. Genetic analysis of the modABCD (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 177 n. 17, p. 4851–4856, 1995.

MEI, J. M. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. **Molecular microbiology**, v. 26 n. 2, p. 399-407, 1997.

MORAES, C. T. et al. Flagellin and GroEL mediates in vitro binding of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to cellular fibronectin. **BMC Microbiology**, v. 15 n. 278, p. 1-10, 2015.

MULLIN, S., MANI, N., GROSSMAN, T. H. Inhibition of Antibiotic Efflux in Bacteria by the Novel Multidrug Resistance Inhibitors Biricodar (VX-710) and Timcodar (VX-853). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48 n. 11, p. 4171–4176, 2004.

NAGY, H. et al. P-glycoprotein conformational changes detected by antibody competition. **European Journal of Biochemistry**, v. 268 n. 8, p. 2416–2420, 2001.

NEUBAUER, H., PANTEL, I. Characterization of the molybdate transport system ModABC of *Staphylococcus carnosus*. **Archives of microbiology**, v. 172 n. 2, p. 109–115, 1999.

OLDHAM, M. L., CHEN, J. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. **Science**, v. 332 n. 6035, p. 1202-1205, 2011.

OLDHAM, M. L. et al. (2007). Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. **Nature**, v. 450 n. 7169, p. 515–521, 2007.

OTTO, M., GÖTZ, F. ABC transporters of *staphylococci*. **Research in microbiology**, v. 152, p. 351–356, 2001.

PHILLIPS, G. N. et al. Structure of L-arabinose-binding protein from *Escherichia coli* at 5 Å resolution and preliminary results at 3.5 Å.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 73 n. 7, p. 2186–2190, 1976.

PORCHERON, G. et al. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1–24, 2013.

RADIN J. N. et al. Synergy between nutritional immunity and independent host defenses contributes to the importance of the MntABC manganese transporter during *Staphylococcus aureus* infection. **Infection and Immunity**, v. 87, p. 1-38, 2018.

RAIBAUD, O., RICHET, E. Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 169 n. 7, p. 3059–3061, 1987.

RIOUX, C. R., KADNER, R. J. Vitamin B12 transport in *Escherichia coli* K12 does not require the btuE gene of the btuCED operon. **Molecular & General Genetics**, v. 217 n. 2, p. 301–308, 1989.

ROBEY, R. W. et al. ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10 n. 8, p. 625–633, 2010.

ROSSMANN, M. et al. Development of a multipurpose scaffold for the display of peptide loops. **PEDS**, v. 30 n. 6, p. 419-430, 2017.

ROY, A., KUCUKURAL, A., ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v. 5 n. 4, p. 725-738, 2010.

RUDIN. L. et al. Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 118 n. 1, p. 155-164, 1974.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHEFFLER, J. M., SCHIEFERMEIER, N., HUBER, L. A. Mild fixation and permeabilization protocol for preserving structures of endosomes, focal adhesions and actin filaments during immunofluorescence analysis. **Methods in enzymology**, v. 535, p. 93-102, 2014.

SEITZ, E. M. et al. RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. **Genes and development**, v.12 n. 9, p. 1248–1253, 1998.

SCHRÖDINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.7

SHELDON, J. R., HEINRICHS, D. E. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 39 n. 4, p. 592–630, 2015.

SONHAMMER, E. L., VON HEIJNE, G., KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**, v. 6, p. 175-182, 1998.

STRANGER-JONES, Y. K., BAE, T., SCHNEEWIND, O. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103 n. 45, p. 16942-16947, 2006.

TAM, R., SAIER, M. H. Structural, Functional, and Evolutionary Relationships among Extracellular Solute-Binding Receptors of Bacteria. **Microbiological reviews**, v. 57 n. 2, p. 320–346, 1993.

TAMURA, G. S., NITTAYAJARN, A., SCHOENTAG, D. L. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B *streptococci*. **Infection and Immunity**, v. 70 n. 6, p. 2877–2885, 2002.

TANABE, M. et al. The ABC Transporter Protein OppA Provides Protection against Experimental *Yersinia pestis* Infection. **Infection and immunity**, v. 74 n. 6, p. 3687-3691, 2006.

TANAKA, K. J. et al. Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860 n. 4, p. 868–877, 2018.

TENNENT, J. M. et al. Physical and Biochemical Characterization of the *qmA* Gene Encoding Antiseptic and Disinfectant Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of general microbiology**, v. 135 n. 1, p. 1–10, 1989.

TER BEEK, J., GUSKOV, A., SLOTBOOM, D. J. Structural diversity of ABC transporters. **The Journal of General Physiology**, v. 143 n. 4, p. 419–435, 2014.

VAN DER HEIDE, T., POOLMAN, B. ABC transporters : one, two or four

extracytoplasmic substrate-binding sites? **EMBO reports**, v. 3 n. 10, p. 938–943, 2002.

VAN VEEN, H. W. et al. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. **EMBO journal**, v. 19 n. 11, p. 2503–2514, 2000.

VELAMAKANNI, S. et al. Multidrug Transport by the ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 47 n. 35, p. 9300–9308, 2008.

VYTVYTSKA, O. et al. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. **Proteomics**, v. 2 n. 5, p. 580–590, 2002.

WOOTTON, J. C. et al. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. **Bioenergetics**, v. 1057 n. 2, p. 157–185, 1991.

YANG, H. et al. Immunisation With Immunodominant Linear B Cell Epitopes Vaccine of Manganese Transport Protein C Confers Protection against *Staphylococcus aureus* Infection. **PloS One**, v. 11 n. 2, p. 1-16, 2016.

YANG, M.; JOHNSON, A.; MURPHY, T. F. Characterization and Evaluation of the *Moraxella catarrhalis* Oligopeptide Permease A as a Mucosal Vaccine Antigen. **Infection and immunity**, v. 79 n. 6, p. 846-857, 2011.

ANEXOS

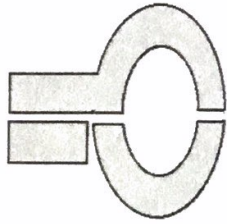
ANEXO 1 - Oligonucleotídeos desenhados para os loops alvos desse trabalho. Os oligonucleotídeos desenhados servem para a amplificação das sequências de nucleotídeos codificadoras de regiões externas dos domínios TMD dos diferentes transportadores de *E. coli* e *S. aureus*. Quando as regiões eram muito extensas, foram desenhados mais de um par de oligonucleotídeos de forma que todos pudessem ser complementares no processo de clonagem independente de ligase (LIC).

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop1.1	GGCGGCGGGCTTAAGGCGGTTCTGCTGGGTCAGGGTCAGCTGCCGA AC T
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop1.2	GGGCGCTGGGTCTGTCTC
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop1.3	CCGCCTCCCTTAAGAGACAGACCCAGCGCCCAGTTCGGCAGCTGACC
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop1.4	CTGACCCAGCAGAACCGCC
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop2.1	GGCGGCGGGCTTAAGGCGATCTACTTCTCTACCTCTGTTGACCTGCG T CAGCC
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop2.2	CCGCCTCCCTTAAGCTGACGCAGGTCAACAGAGGTAGAGAAGTAGAT C GCC
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop3.1	GGCGGCGGGCTTAAGCGTCTGGCGCTGGCGGGCGGGAAGTCCG ATCGGTGTTGTTCC
<i>E. coli</i> B12_Btu_loop3.2	CCGCCTCCCTTAAGAACAACACCGATCGGCAGTTCGCCGCCGCCAG C GCCAGACGC
<i>E. coli</i> Mo_ModB_loop1.1	GGCGGCGGGCTTAAGATGGGTGCTCGTGGTTTCATCGGTGAA
<i>E. coli</i> Mo_ModB_loop1.2	CGTCTGTACGACTGGTTCGGTATCACCTTCGCGTTCTCTTGGCGTGGT C
<i>E. coli</i> Mo_ModB_loop1.3	CCGCCTCCCTTAAGACCACGCCAAGAGAACGCGAAGGTGAT
<i>E. coli</i> Mo_ModB_loop1.4	ACCGAACAGTCGTACAGACGTTACCGATGAAACCACGACGCCA T C
<i>E. coli</i> Mo_ModB_loop2.1	GGCGGCGGGCTTAAGATGTACACCCTGATCCAGACCCCGGGTGGTG AA TCTGGTGCGGCGC
<i>E. coli</i> Mo_ModB_loop2.2	CCGCCTCCCTTAAGCGCCGACCCAGATTACCACCCGGGGTCTGGAT C AGGGTGTACATC
<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.1	GGCGGCGGGCTTAAGTGGCAGGCGGGTAAAACCTACAACCTCGGTC
<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.2	TGTACCCGGCGGGTGACGAATGGCAGCTGGCGCTGTCTGACGGTGA A
<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.3	ACCGGTAAAACCTACCTGTCTGACGCGTTCAAATTCGGTGGTGAACA
<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.4	GAAACTGCAGCTGAAAGAAACCACCGCGCAGCCGGAAGGTGAACGT G

<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.5	CGAACCTGCGTGTTATCACCCAGAACCGTCAGGCGCTGTCTGACATC
<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.6	ACCGCGATCCTGCCGGACGGTAACAAAGTTATGATGTCTTCTCTGCGT C
<i>E. coli</i> Mal_MalF_loop1.7	AGTTCTCTGGTACCCAGCCGC
<i>E. coli</i> Mal_MalG_loop2.1	CCGCCTCCCTTAAGCGGCTGGGTACCAGAGAAGTACGCGCAGAGAAGA C ATCATA
<i>E. coli</i> Mal_MalG_loop2.2	ACTTTGTTACCGTCCGGCAGGATCGCGGTGATGTCAGACAGCGCCTG A C
<i>E. coli</i> Mal_MalG_loop2.3	GTTTCTGGGTGATAACACGCAGGTTCCGACGTTACCTTCCGGCTGC G C
<i>E. coli</i> Mal_MalG_loop2.4	GGTGGTTTCTTTCAGCTGCAGTTTCTGTTACCACCGAATTTGAACGC G
<i>E. coli</i> Mal_MalG_loop2.5	TCAGACAGGTAGTTTTTACCGTTTTACCGTCAGACAGCGCCAGCTG C C
<i>E. coli</i> Mal_MalG_loop2.6	ATTCGTCACCCGCCGGGTACAGACCGAAGTTGTAGTTTTACCCGCC T GCCAC
<i>S. aureus</i> Mal_MalD_loop1.1	GGCGGCGGGCTTAAGGCCTGTTAACTTTATTAAC
<i>S. aureus</i> Mal_MalD_loop1.2	GATAAATATGCGAACAATTTACCGTGTTCGCGGCGC
<i>S. aureus</i> Mal_MalD_loop1.3	CCGCCTCCCTTAAGCGCCGCAACACGGTAAAGTTG
<i>S. aureus</i> Mal_MalD_loop1.4	TTCGCATATTTATCGTTAATAAAGTTAAACAGGCC
<i>S. aureus</i> Mo_ModB_loop1.1	GGCGGCGGGCTTAAGCTGATGGTGGCGGGCTATATTCCGAACAAAAC CAACACCCTGC
<i>S. aureus</i> Mo_ModB_loop1.2	CCGCCTCCCTTAAGCAGGGTGTGGTTTTGTTTCGGAATATAGCCCGC CACCATCAGC
<i>S. aureus</i> Sav1866_loop1.1	GGCGGCGGGCTTAAGGCGATTGATTGATGGCGTGATTAACA
<i>S. aureus</i> Sav1866_loop1.2	ACCATGCGCTGACCACCGATGAAAAAGTGCATCATCTGC
<i>S. aureus</i> Sav1866_loop1.3	CCGCCTCCCTTAAGCAGATGATGCACTTTTTTCATCGGT
<i>S. aureus</i> Sav1866_loop1.4	GGTCAGCGCATGGTTGTTAATCACGCCATCAATCGCC

ANEXO 2 - Diluição usada dos diferentes anticorpos primários no procedimento de *Western Blot*. Valores arbitrários de diluição para cada amostra de anticorpos de acordo com seus valores de título, valores de diluição são dados em μL .

Anticorpos	Diluição (μL)
Anti-C1	1:800
Anti-C2	1:250
Anti-C3	1:400
Anti-B2	1:1500
Anti-G	1:1500
Anti-D	1:400



Certificado



Certificamos que **GABRIEL S GUERRA** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 09 de setembro de 2016, com carga horária total de 6 horas.

Gabriel Padilla

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Veridiana Munford

Veridiana Munford
Técnica Responsável pelo Treinamento

Declaro, para os devidos fins, que

Gabriel Guerra

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 16 fevereiro 2018
(Declaração válida por 5 anos)



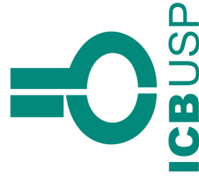
Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos



Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira
Diretor do ICB



Uso de animais para experimentação



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Gabriel Guerra

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 10 novembro 2017
Comissão de Biotérios
ICB USP