



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

SUELEN CARNEIRO DE MEDEIROS

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIPANOCIDA DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE rCV2736 DE *Chromobacterium violaceum* PRODUZIDA EM
CÉLULAS DE *Pichia pastoris*

FORTALEZA

2018

SUELEN CARNEIRO DE MEDEIROS

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIPANOCIDA DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE rCV2736 DE *Chromobacterium violaceum* PRODUZIDA EM
CÉLULAS DE *Pichia pastoris***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e inovação tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Desenvolvimento de Produtos e processos farmacêuticos.

Orientador: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

Coorientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M44p Medeiros, Suelen Carneiro de.
POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIPANOCIDA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rCV2736
DE *Chromobacterium violaceum* PRODUZIDA EM CÉLULAS DE *Pichia pastoris* / Suelen Carneiro de
Medeiros. – 2018.
125 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos -
Associação UFC/UFPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.
Coorientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. Quitina.. 2. Petidoglicano. 3. Expressão heteróloga. I. Título.

CDD.615.1

SUELEN CARNEIRO DE MEDEIROS


**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E TRIPANOCIDA DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE rCV2736 DE *Chromobacterium violaceum* PRODUZIDA EM
CÉLULAS DE *Pichia pastoris***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e inovação tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Desenvolvimento de Produtos e processos farmacêuticos.


Aprovada em: 15/06/2018.

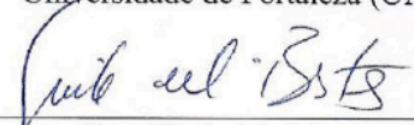
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Nádya Accioly Pinto Nogueira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)


Dra. Gisele Medeiros Bastos
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

A Deus.

A minha família, Liduina, Lucivaldo e Victor.

Aos meus amores Igor e Preta.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força sem a qual eu não conseguiria continuar caminhando.

Ao meu esposo, Igor, por toda cumplicidade e compreensão todos estes anos.

Aos meus pais Liduina e Lucivaldo, e meu irmão Victor, por serem o pilar que sempre me amparava.

À minha orientadora Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira, pela orientação e pelos ensinamentos, mas principalmente pela amizade, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pelo apoio durante a minha formação acadêmica. Pela amizade, incentivo e parceria durante esse tempo.

À professora Maria Aparecida Oliveira Alves por seu exemplo de perseverança e humildade. Pelas palavras de incentivo e todos os ensinamentos ao longo de todos esses anos.

A professora Dra. Alice Maria Costa Martins pelo aceite em compor a banca de defesa de tese e apoio nos experimentos com *Trypanosoma cruzi*.

Ao professor Dr. Renato Moreira (UNIFOR) pelo aceite em compor a banca de defesa de tese.

A Dra Gisele Medeiros Bastos, Dr José Edvar Monteiro Júnior e a profa Dra Maria Goretti Rodrigues de Queiroz pelo aceite em compor a banca de defesa de tese.

Ao Nubex (Núcleo de Biologia Experimental), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) pelos experimentos de espectrometria de massas e cromatografia, bem como à professora Dra. Marina Lobo e Dr. Frederico Bruno, pelo auxílio em todas as etapas.

Ao doutorando Jader Almeida Canuto pelos experimentos com *Trypanosoma cruzi*.

Aos amigos (irmãos) do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro): Gleilton, Andressa, Valéria, Matheus e Pedro Igor, pelo apoio sempre que precisava, pelas conversas e momentos de descontração. O apoio de vocês foi fundamental na minha caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular, Simone, Mayara, Mirele, Jéssica, Jéssica Lorem, Edvar, Ednésio, Antonio Viana e Juscelino. Pelo apoio sempre

constante. Pelos nossos cafés que sempre nos deixavam mais leves para continuar nossa batalha diária. O apoio de vocês foi fundamental na minha caminhada.

Aos amigos do doutorado, Renata, Paloma, Racquel, Anselmo, Rodrigo, Umberto e Deborah, por tornarem mais leve e prazerosa nossas viagens pelas disciplinas. Pela amizade sincera e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

As grandes amigas Kharla e Thalita, pelo apoio e amizade, e pelas longas conversas sobre o que realmente a gente leva na bagagem de tudo o que passamos.

As super-poderosas, Valesca, Juliana e Mariana, pelas conversas e apoio, mesmo a distância, com nossos cafés virtuais.

Aos funcionários do departamento de farmácia e departamento de análises clínicas e toxicológicas, em especial a Raimundinha e Jéssica, por aguentarem diariamente nosso desespero de estudante e sempre ter um sorriso no rosto que acalma e fortalece nosso dia-a-dia.

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:

Universidade Federal do Ceará (UFC).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Ceará (FUNCAP).

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (Labmicro), Departamento de Análises clínicas e toxicológicas, Universidade Federal do Ceará.

Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais, Departamento de Análises clínicas e toxicológicas, Universidade Federal do Ceará.

Núcleo de Biologia Experimental (Nubex), Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

Departamento de Análises clínicas e toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.

“Ciência é atrevimento e experiência em
doses iguais.”

Efraim Rodrigues

RESUMO

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem levado ao surgimento de microrganismos apresentando resistência a antibióticos. O estudo de genes de vários organismos se tornou uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos. *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativo, apresentando ORFs (*Open Reading Frame*) que codificam para proteínas de uso biotecnológico. rCV2736 é uma *Chitinase-like* recombinante, produzida em *Pichia pastoris* KM71H, que apresentou baixa atividade quitinolítica, porém com atividade antibacteriana. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da proteína recombinante de *C. violaceum* ATCC 12472, rCV2736, como um antimicrobiano, bem como determinar seu mecanismo de ação. Para isso, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia hidrofóbica e caracterizada por sequenciamento N-terminal, deglicosilação, espectrometria de massas, atividade quitinásica e peptidoglicano hidrolase. Atividade biológica foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) por microdiluição em caldo, efeito do tempo de exposição na viabilidade bacteriana, efeito da alteração do pH na atividade antimicrobiana, efeito modulador na atividade de antimicrobianos de uso clínico, atividade antibiofilme, atividade antiparasitária, hemotoxicidade e simulação por *Docking molecular*. rCV2736 apresentou 3 isoformas após purificação. A sequência N-terminal da proteína correspondente a banda com 42 kDa apresentou 33 aminoácidos, dentre eles os resíduos adicionados pelo vetor de expressão. Bandas com massas moleculares aparentes de 35.682 Da e 34.988 Da, foram visualizadas devido à deglicosilação pela enzima N-glicosidase F. A espectrometria de massas revelou peptídeos correspondendo a porção C e N-terminal, e O e N-glicosilações. A atividade quitinásica aumentou (137,5 U) com maior tempo de incubação (24 h), com quitina coloidal. Avaliando a presença de NaCl na amostra, não houve diferença entre as concentrações testadas. A interação com Ba^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} causou diminuição da atividade relativa acima de 50%. Na atividade peptidoglicano hidrolase, foram visualizadas bandas compatíveis com lise celular com massa molecular aparente referente a rCV2736. rCV2736 inibiu o crescimento de todas as cepas testadas, sendo bactericida para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031 (365 µg/mL). Esta mesma concentração inviabilizou o crescimento dessas cepas após 4h e 8 h, respectivamente. O aumento do pH do meio de cultura reduziu o potencial antibacteriano da rCV2736 para as bactérias citadas. O efeito sinérgico foi constatado para associações com ceftazidima, tetraciclina e amicacina. rCV2736 foi capaz de inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* nas concentrações acima de 182,5 µg/mL, porém

redução no número de UFC/ml foi observada para as concentrações usadas sobre o biofilme formado. rCV2736 apresentou IC₅₀ de 1089 µg/mL nos ensaios utilizando epimastigotas, e 118,3 µg/mL para tripomastigotas. rCV2736 não se apresentou hemotóxica. Nas simulações de docking molecular foi possível observar que os dois ligantes [(GlicNac)₄ e (GlcNAc-MurNAc)₂] interagiram de forma favorável na fenda catalítica predita, onde visualizou-se interação entre o resíduo responsável pela catálise (Glu¹¹⁰) e o átomo de oxigênio da ligação glicosídica. Portanto, rCV2736 pode ser considerada como uma molécula com potencial antibacteriano e antiparasitário, onde seu possível mecanismo de ação antibacteriano pode ser explicado pelo efeito enzimático sobre a molécula do peptidoglicano.

Palavras-chave: Quitina. Petidoglicano. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobials has led to the emergence of microorganisms presenting resistance to antibiotics. The study of genes from various organisms has become an alternative in the development of new drugs. *Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative bacterium, presenting ORFs (Open Reading Frame) that code for proteins of biotechnological use. rCV2736 is a recombinant Chitinase-like, produced in *Pichia pastoris* KM71H, which presented low chitinolytic activity, but with antibacterial activity. This work aimed to evaluate the potential of the recombinant protein of *C. violaceum* ATCC 12472, rCV2736, as an antimicrobial, as well as to determine its mechanism of action. For this, the recombinant protein was purified by hydrophobic chromatography and characterized by N-terminal sequencing, deglycosylation, mass spectrometry, chitinase activity and peptidoglycan hydrolase. Biological activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) by microdilution in broth, effect of exposure time on bacterial viability, effect of pH change on antimicrobial activity, modulating effect on antimicrobial activity of clinical use, antibiofilm activity, antiparasitic activity, hemotoxicity and simulation by molecular docking. rCV2736 showed 3 isoforms after purification. The N-terminal sequence of the protein corresponding to the 42 kDa band presented 33 amino acids, among them residues added by the expression vector. Bands with apparent molecular weights of 35,682 Da and 34,988 Da were visualized due to deglycosylation by the enzyme N-glycosidase F. Mass spectrometry revealed peptides corresponding to the C and N-terminal portion, and O and N-glycosylations. Chitinase activity increased with longer incubation time (24 h) with colloidal chitin (137,5 U). Evaluating the presence of NaCl in the sample, there was no difference between the concentrations tested. The interaction with Ba^{2+} , Ni^{2+} and Fe^{3+} caused a decrease in relative activity above 50%. In the peptidoglycan hydrolase activity, bands related to cell lysis with apparent molecular weight relative to rCV2736 were visualized. rCV2736 inhibited the growth of all strains tested, being bactericidal for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031 (365 µg/ml). This same concentration prevented the growth of these strains after 4 h and 8 h, respectively. Increasing the pH of the culture medium reduced the antibacterial potential of rCV2736 for the above bacteria. The synergistic effect was observed for combinations with ceftazidime, tetracycline and amikacin. rCV2736 was able to inhibit the formation of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* biofilms at concentrations above 182.5 µg/mL, but a reduction in the number of CFU/mL was observed for the concentrations used on the biofilm formed. rCV2736 showed IC₅₀ of 1089 µg/mL in the assays

using epimastigotes, and 118.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for trypomastigotes. rCV2736 did not present haemotoxic effects. In the molecular docking simulations, it was possible to observe that the two ligands [(GlcNAc)₄ and (GlcNAc-MurNAc)₂] interacted favorably in the predicted catalytic cleft, where interaction between the residue responsible for catalysis (Glu¹¹⁰) and oxygen atom of the glycosidic bond. Therefore, rCV2736 can be considered as a molecule with antibacterial and antiparasitic potential, where its possible mechanism of antibacterial action can be explained by the enzymatic effect on the peptidoglycan molecule.

Keywords: Chitin. Peptidoglycan. Heterologous expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquema dos mecanismos gerais de catálise de glicosilhidrolase (GHs).....	31
Figura 2	– Estrutura esquemática de um peptidoglicano de um organismo Gram-positivo e os sítios de catálise das peptidoglicano hidrolases (PHs).....	34
Figura 3	– Aspectos morfológicos das colônias de <i>Chromobacterium violaceum</i> cultivadas em ágar Lennox (ágar LB).....	36
Figura 4	– Fluxograma do desenho experimental das etapas do trabalho.....	43
Figura 5	– Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenyl sepharose de rCV2736.....	62
Figura 6	– Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da reação de deglicosilação das isoformas de rCV2736 utilizando as enzimas N-Glicosidase F e O-Glicosidase.....	64
Figura 7	– Efeito de diferentes concentrações de NaCl, com 1 h e 24 h de incubação, sobre a atividade quitinásica da rCV2736 (fração F0/95 do meio de cultura livre de células de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736), tendo quitina coloidal como substrato.....	73
Figura 8	– Efeito de diferentes íons metálicos, com 1 h de incubação, sobre a atividade quitinásica da rCV2736 (fração F0/95 do meio de cultura livre de células de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736), tendo quitina coloidal como substrato.....	74
Figura 9	– SDS-PAGE e zimograma para detecção da atividade peptidoglicano hidrolase da rCV2736 fração F0/95 do meio de cultura livre de células de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736).....	75
Figura 10	– SDS-PAGE e zimograma para detecção da atividade peptidoglicano hidrolase da rCV2736 (fração F0/95 do meio de cultura livre de células de <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736).....	76
Figura 11	– Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de rCV2736 para <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. cholerauis</i>	78

Figura 12 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de rCV2736 para <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumonia</i>	79
Figura 13 – Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027.....	80
Figura 14 – Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031.....	81
Figura 15 – Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB) de rCV2736 sobre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027.....	85
Figura 16 – Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB) de rCV2736 sobre <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031.....	85
Figura 17 – Viabilidade celular de formas epimastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com rCV2736.....	88
Figura 18 – Viabilidade celular de formas tripomastigota da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com rCV2736.....	89
Figura 19 – Atividade hemolítica da rCV2637 sobre eritrócitos de carneiro.....	90
Figura 20 – Ligantes utilizados na simulação por <i>Docking molecular</i> com rCV2736.....	94
Figura 21 – Modelos tridimensionais gerados para rCV2736 com os ligantes (GlcNAc-MurNAc) ₂ e (GlicNac) ₄ , evidenciando os aminoácidos envolvidos na interação.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Identificação dos <i>spots</i> retirados do gel de eletroforese (SDS-PAGE) a partir da fração 0/95, de possíveis isoformas de rCV2736 produzida em <i>P. pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736, por espectrometria de massas (técnica de ionização por eletropulverização, <i>electrospray</i>).....	65
Tabela 2	– Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (<i>liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry</i>) da sequência de aminoácidos de rCV2736, referente a banda de 42 kDa (BI).....	67
Tabela 3	– Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (<i>liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry</i>) da sequência de aminoácidos de rCV2736, referente a banda de 38,1 kDa (BII).....	69
Tabela 4	– Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (<i>liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry</i>) da sequência de aminoácidos de rCV2736, referente a banda de 36,2 kDa (BIII).....	71
Tabela 5	– Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de rCV2736.....	77
Tabela 6	– Efeito do pH na atividade antibacteriana de rCV2736 sobre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 e <i>K. pneumonia</i> ATCC 10031.....	82
Tabela 7	– Efeito modulador da rCV2736 na atividade antimicrobiana de antimicrobianos de uso clínico sobre o crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027.....	83
Tabela 8	– Efeito modulador da rCV2736 na atividade antimicrobiana de antimicrobianos de uso clínico sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031.....	83
Tabela 9	– Concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) de rCV2736 sobre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 e <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031.....	86
Tabela 10	– Análise estatística dos parâmetros estereoquímicos da estrutura tridimensional do modelo gerado para rCV2736.....	92
Tabela 11	– Valores de energia dos modelos para <i>docking molecular</i> utilizando como	95

ligante o tetrassacarídeo [(GlcNAc-MurNAc) ₂].....	
Tabela 12 – Valores de energia dos modelos para <i>docking molecular</i> utilizando como ligante o tetrassacarídeo[(GlcNAc) ₄].....	96
Tabela 13 – Pontes de hidrogênio entre rCV2736 e o tetrassacarídeo (GlcNAc-MurNAc) ₂	97
Tabela 14 – Pontes de hidrogênio entre rCV2736 e o tetrassacarídeo (GlcNAc) ₄	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AOX	Álcool oxidase
ATB	Antimicrobiano
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BMGY	<i>Buffered complex glycerol medium</i>
BMMY	<i>Buffered complex metanol medium</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAZy	<i>Carbohydrate-active enzymes database</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFLE	<i>Cortical fragment-lytic enzyme</i>
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima no Biofilme
CMEB	Concentração mínima de erradicação do biofilme
COOT	<i>Crystallographic Object-Oriented Toolkit</i>
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
D-Glu	D-glutamato
Da	Daltons
DMAB	p-dimetilaminobenzaldeído
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EPV	Epstein-Barr vírus
FC	Fator de correção
FD	Fator de diluição
FIC	Concentração inibitória fracionada
GH	Glicosil hidrolases

GlcNAc	N-acetil- β -D-glucosamina
HCl	Ácido clorídrico
HEWL	<i>Hen egg-white lysozyme</i>
ICB	Inibição do Crescimento do Biofilme
IFIC	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
L-Ala	L-alanina
L-di-A	ácido mesodiaminopimélico
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
LB	<i>Lisogenic broth</i>
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
MurNAc	ácido N-acetilmurâmico
ORFs	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PHs	Peptidoglicano hidrolases
pI	Ponto isoelétrico
PR	proteínas relacionadas a patogênese
PVDF	fluoreto de polivinilideno
QS	<i>Quorum Sensing</i>
rCV2736	CV2736 recombinante
RPM	<i>Rotações por minute</i>
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
SFB	Soro fetal bovino
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado
TIM	Triose fosfato isomerase
UFC	Unidades formadoras de colônia
YPDS	<i>Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Resistência Bacteriana.....	27
2.2	Glicosil Hidrolases (GHs).....	29
2.1.1	<i>Quitinases</i>	30
2.3	Peptidoglicano Hidrolases (PHs).....	33
2.4	<i>Chromobacterium violaceum</i>	35
2.5	rCV2736.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAL.....	41
4.1	Cepas de bactérias e leveduras.....	41
4.2	Linhagens celulares.....	41
4.3	Enzimas e demais reagentes.....	41
5	MÉTODOS.....	43
5.1	Aspectos éticos.....	43
5.2	Produção da proteína recombinante (rCV2736) a partir de células de <i>Pichia pastoris</i> KM71H::pPICZ α A::CV2736.....	44
5.3	Purificação da proteína recombinante (rCV2736).....	44
5.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS- PAGE).....	45
5.5	Caracterização bioquímica parcial de rCV2736.....	46
5.5.1	<i>Sequenciamento da porção N-terminal da proteína recombinante</i>	46
5.5.2	<i>Reação de deglicosilação com as enzimas N-glicosidase e O-glicosidase</i>	46
5.5.3	<i>Espectrometria de massas</i>	47
5.5.4	<i>Determinação da Atividade quitinásica da rCV2736</i>	48
5.5.4.1	<i>Efeito do tempo de incubação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal</i>	49

5.5.4.2	<i>Efeito da concentração de NaCl e do tempo de reação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal.....</i>	49
5.5.4.3	<i>Efeito da presença de metais na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal.....</i>	50
5.5.5	<i>Zimografia para detecção da atividade hidrolase de peptidoglicanos.....</i>	50
5.6	Atividade biológica de rCV2736.....	51
5.6.1	<i>Determinação da atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736.....</i>	51
5.6.1.1	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</i>	51
5.6.1.2	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM).....</i>	52
5.6.1.3	<i>Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade das cepas P. aeruginosa ATCC 9027 e K. pneumoniae ATCC 10031.....</i>	53
5.6.1.4	<i>Efeito da alteração de pH na atividade antimicrobiana da rCV2736 sobre P. aeruginosa ATCC 9027 e K. pneumoniae ATCC 10031.....</i>	53
5.6.1.5	<i>Efeito modulador da proteína recombinante rCV2736 na atividade de antimicrobianos (ATB) de uso clínico.....</i>	54
5.6.2	<i>Determinação da atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre células microbianas em biofilme.....</i>	55
5.6.2.1	<i>Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB).....</i>	55
5.6.2.2	<i>Detecção da concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB).....</i>	56
5.6.3	<i>Determinação da atividade tripanocida in vitro da proteína recombinante rCV2736.....</i>	57
5.6.3.1	<i>Sobre a forma epimastigota de Trypanosoma cruzi.....</i>	57
5.6.3.2	<i>Sobre a forma tripomastigota de Trypanosoma cruzi.....</i>	58
5.6.4	<i>Determinação de Hemotoxicidade.....</i>	58
5.7	Docking molecular.....	59
5.7.1	<i>Determinação da estrutura tridimensional da rCV2736 por modelagem molecular por homologia.....</i>	59
5.7.2	<i>Avaliação da qualidade do modelo.....</i>	59
5.7.3	<i>Simulação de docking molecular.....</i>	60
6	RESULTADOS.....	61
6.1	Purificação da proteína recombinante.....	61
6.2	Caracterização bioquímica parcial de rCV2736.....	63

6.2.1	Sequenciamento N-terminal de rCV2736.....	63
6.2.2	Deglicosilação com as enzimas N e O-glicosidase.....	63
6.2.3	Spectrometria de massas.....	65
6.2.4	Atividade quitinásica da rCV2736.....	73
6.2.4.1	<i>Efeito do tempo de incubação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal.....</i>	73
6.2.4.2	<i>Efeito da concentração de NaCl e do tempo de reação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal.....</i>	73
6.2.4.3	<i>Efeito da presença de metais na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal.....</i>	74
6.2.5	Atividade peptidoglicano hidrolase de rCV2736.....	75
6.3	Atividade biológica de rCV2736.....	77
6.3.1	Atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre células microbianas em crescimento planctônico.....	77
6.3.1.1	<i>Concentrações inibitória mínima e bactericida mínima.....</i>	77
6.3.1.2	<i>Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade das cepas P. aeruginosa ATCC 9027 e K. pneumonia ATCC 10031.....</i>	80
6.3.1.3	<i>Efeito da alteração de pH na atividade antimicrobiana de rCV2736 sobre P. aeruginosa ATCC 9027 e K. pneumonia ATCC 10031.....</i>	81
6.3.1.4	<i>Efeito modulador da proteína recombinante rCV2736 na atividade de antimicrobianos (ATB) de uso clínico.....</i>	82
6.3.2	Atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre biofilmes de P. aeruginosa ATCC 9027 e K. pneumonia ATCC 10031.....	84
6.3.2.1	<i>Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB).....</i>	84
6.3.2.2	<i>Concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB).....</i>	84
6.3.3	Atividade antiparasitária in vitro da proteína recombinante rCV2736.....	87
6.3.3.1	<i>Sobre as formas epimastigota e tripomastigota de Trypanosoma cruzi.....</i>	87
6.3.4	Hemotoxicidade de rCV2736.....	90
6.4	Docking molecular.....	91
6.4.1	Estrutura tridimensional de rCV2736 por modelagem molecular por homologia.....	91
6.4.2	Simulação de docking molecular.....	93
7	DISCUSSÃO.....	98

8	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
	ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	119
	ANEXO B - SEQUENCIA COMPLETA DE AMINOÁCIDOS DE rCV2736.....	121
	ANEXO C - MAPA DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO pPICZαA.....	122
	ANEXO D - INFORMAÇÕES SOBRE C. violaceum ATCC 12472.....	123
	ANEXO E - AUTORIZAÇÃO DA CTNBIO (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA) PARA MANIPULAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	124
	APÊNDICE A - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DO TRABALHO DE TESE.....	125

1 INTRODUÇÃO

A crescente resistência microbiana aos antimicrobianos disponíveis no mercado tem determinado um aumento na busca de novas substâncias potencialmente eficazes em combater infecções por microrganismos. No entanto, o alto custo na descoberta e produção de novos fármacos com ação antimicrobiana, pode inviabilizar esses processos.

Dessa forma, o estudo de genes a partir do genoma de vários organismos se tornou uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos. Em alguns organismos, o estudo dos produtos gênicos pode ser muito complexo devido a baixa quantidade em que o produto é obtido. Assim, o processo de expressão heteróloga, onde há a transferência de genes para vetores procariontes ou eucariontes, auxilia na avaliação da funcionalidade biotecnológica de produtos gênicos.

Chromobacterium violaceum é uma bactéria saprófita, Gram-negativo, não patogênica, aeróbica facultativa, de vida livre, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais, em vários continentes. O sequenciamento do genoma de *C. violaceum* mostrou sequências para vias alternativas de geração de energia, ORFs (*Open Reading Frame*) relacionadas ao transporte, adaptação ao estresse e a mobilidade. Foram encontradas também regiões que codificam para proteínas relacionadas à patogênese. Muitos desses produtos apresentam grande potencial biotecnológico, no que se refere ao combate a pragas de culturas importantes e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (CASTRO et al., 2015).

Das ORF que codificam para proteínas relacionadas a patogênese, CV2736 é uma *Chitinase-like*, da família 18 das glicosil hidrolases (GH18), que apresenta 315 aminoácidos codificados por uma ORF de 915 pb do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 (MEDEIROS, 2012). Análises *in silico* mostram que esta quitinase possui um único domínio catalítico (resíduos de 16 a 305) em sua estrutura primária, não possuindo qualquer outro domínio acessório, como domínio de ligação à quitina, (PUNTA et al., 2011; LETUNIC; DOERKS; BORK, 2011; SCHULTZ et al., 1998; MARCHLER-BAUER et al., 2011). Sua massa molecular e pI teórico, calculados com base na sequência de aminoácidos, é de 33.743,6 Da e 5,32, respectivamente.

rCV2736 foi produzida de forma recombinante em células de *Pichia pastoris* KM71H, apresentando glicosilações na molécula, o que alterou a massa molecular aparente, após eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-

PAGE). Esta proteína apresentou baixa atividade quitinolítica, em ensaios utilizando quitina coloidal como substrato, porém em ensaios de antibiograma por microdiluição em caldo, utilizando a fração proteica bruta contendo a proteína recombinante, esta apresentou atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (MEDEIROS, 2012). Este fato pode ser explicado devido a sequência de aminoácidos da proteína nativa CV2736 apresentar similaridade significativa com proteínas classificadas na subfamília *CFLE* (*Cortical fragment-lytic enzyme*) da super-família *Chitinase-like*, que também inclui uma hidrolase de *Bacillus cereus*, relacionada ao processo de esporulação. Esse tipo de proteína age sobre os peptidoglicanos da parede do esporo, auxiliando em sua germinação (KODAMA *et al*, 2000; CHEN *et al*, 2000). Além disso, elas também estão relacionadas aos processos de divisão celular, crescimento celular, autólise, dentre outros (VOLLMER *et al.*, 2008a). Proteínas deste grupo também já foram descritas na literatura, encontradas em *Bacillus anthracis*, chamadas SleL (YaaH). Esta proteína possui três domínios conservados: dois domínios N-terminais LysM e um domínio GH18 (LAMBERT; SHERRY; POPHAM, 2012). Devido a esta similaridade, rCV2736 pode ser uma potencial molécula com atividade antibacteriana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência Bacteriana

Resistência bacteriana é um fenômeno em que os microrganismos adquirem a capacidade de resistir a um determinado fármaco, ocorrendo através de genes de resistência e genes com potencial para a resistência pertencentes ao genoma microbiano (CAUMO et al., 2010). Segundo Baquero e Blázquez (1997), a resistência pode ser considerada como a interação entre um antibiótico e um genótipo específico, sendo seu produto obtido devido o acaso. Bactérias podem adquirir resistência a antibióticos devido a alterações cromossômicas, indução da expressão de genes que estavam latentes por pressões seletivas e troca de DNA por mecanismos de transformação, transdução ou conjugação (NEU, 1992).

Alguns microrganismos podem ser naturalmente resistentes a um antimicrobiano, sendo esta resistência conferida pela impossibilidade do agente antimicrobiano penetrar na célula bacteriana, do organismo modificar o antibiótico (inativando-o), pela modificação do alvo do antibiótico, pelo microrganismo não possuir a estrutura que seria inibida pelo antibiótico e, finalmente, por transferências genéticas (MADIGAN et al, 2004). Baquero (2011) considera fatores evolutivos como um processo complexo que também leva à resistência de microrganismos.

Os principais mecanismos que propiciam o surgimento de cepas resistentes envolvem alterações nas bombas de efluxo, inativação enzimática, alterações na permeabilidade da membrana plasmática e modificações no sítio de ligação do antibiótico (LOUREIRO et al., 2016). A própria arquitetura celular facilita a proteção dos microrganismos contra agentes antimicrobianos, como por exemplo a estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativo, com a presença de uma camada externa lipopolissacarídica. Nessas cepas também é bastante comum o mecanismo de produção de β -lactamases, com capacidade de hidrólise do anel β -lactâmico de antibióticos, tais como cefalosporinas e penicilinas (CAUMO et al., 2010; HANCOCK, 2005).

O uso indiscriminado de antimicrobianos, como por exemplo, sua prescrição em casos não infecciosos ou o uso em doses subletais, bem como sua utilização como fator de crescimento de muitas culturas animais e como medida profilática, tem levado a seleção de cepas de microrganismos resistentes a vários antibióticos. Além desses pontos, a contaminação ambiental pelo descarte inapropriado de antibióticos ou por águas

residuais contaminadas também pode criar uma pressão seletiva que propicia o fenômeno de resistência bacteriana (MCADAMS, 2017). A preocupação com o uso de antimicrobianos coincide temporalmente com os anos 50 e 60, com a utilização de antibióticos beta-lactâmicos, e nas décadas de 80 e 90 com o aparecimento de formas de resistência e a disseminação de cepas multiresistentes (TAVARES, 2000).

Desde o início da utilização de antimicrobianos no mundo, o fenômeno da resistência teve um crescimento progressivo, aumentando em níveis maiores nos últimos 15 anos (LOUREIRO et al., 2016). No caso de *Staphylococcus aureus*, sua ampla resistência a vários antimicrobianos é disseminada em todo o mundo. Um aumento no número de casos de *S. aureus* meticilina-resistentes (MRSA) na década de 90 gerou avanços no desenvolvimento de novos antimicrobianos com uso específico para organismos Gram-positivo, casos de resistência para esses agentes já são conhecidos (THEURETZBACHER, 2011).

De acordo com Bassetti *et al.* (2017), nos últimos anos nenhuma das medidas de controle de uso de antimicrobianos, bem como medidas de prevenção a infecções conseguiu diminuir as taxas de resistência e a disseminação de microrganismos Gram-negativo, como *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias resistentes a carbapenem e *Acinetobacter baumannii* resistentes a colistinas, dentre outras.

Um dos maiores problemas da resistência é a dificuldade em se descobrir um novo antimicrobiano e lançá-lo no mercado, devido aos custos elevados e o longo tempo para a realização de testes, até que o antimicrobiano possa estar disponível no mercado (VENTOLA, 2015). Segundo Azevedo (2008), mais de 4.000 antibióticos são conhecidos, mas ou os custos para a produção do antimicrobiano são muito onerosos ou a droga em questão tem sua toxicidade muito elevada, fatos estes que inviabilizam o seu uso.

Moellering (2011) lista várias substâncias que são utilizadas como antimicrobiano, tais como ácido fusídico, lisostafina e pleuromutilina. Alguns centros de pesquisa farmacêutica usam como alternativa a busca de novas substâncias em organismos não cultiváveis, como a novolactamicina e novo-biomicina, descobertos pela NovoBiotic Pharmaceuticals. Além destes, macrolactâmicos glicosilados também foram encontrados por essa metodologia de pesquisa, porém apresentaram moderada toxicidade (GENILLOUD, 2014). Novas metodologias são utilizadas na busca de substâncias capazes de combater microrganismos cada vez mais resistentes as substâncias clássicas utilizadas na terapia. Uso de peptídeos antimicrobianos, terapia com fagos, sistema de

edição de genes, terapias complementares anti-virulência, descoberta de fitoquímicos, uso de metais conjugados com antimicrobianos e inibidores de bombas de efluxo são exemplos dessas alternativas (BASSETTI et al., 2017).

Por esse motivo, há uma procura por novas moléculas com potencial antimicrobiano, sendo a busca nos bancos de genomas por genes que codificam para proteínas com esse potencial, uma metodologia bastante promissora. Proteínas com função enzimática são alvos bastante estudados, como por exemplo as proteínas com atividade quitinolítica, possuindo estas amplas funções na natureza em vários processos.

2.2 Glicosil Hidrolases (GHs)

As Glicosilhidrolases (GHs) (EC 3.2.1.-) são enzimas pertencentes ao metabolismo de carboidratos, amplamente distribuídas entre os domínios Archaea, Bacteria e Eukarya. Neste grupo estão 135 famílias de enzimas, capazes de realizar hidrólise ou transglicosilação em ligações glicosídicas (glicosidases e transglicosidases), que compartilham similaridades na sua estrutura terciária, bem como em seu mecanismo de ação, e 6 famílias foram excluídas dessa classificação por não apresentarem capacidade de proporcionar a quebra na ligação glicosídica (GH 21, 40, 41, 60, 61 e 69), de acordo com o banco de dados CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*) (CANTAREL et al., 2009a). Uma nova família foi acrescentada à classificação (GH 115) VUONG; WILSON, 2010). Essas enzimas são capazes de clivar ligações glicosídicas de glicanos e glicoconjugados, tendo, portanto, importância ecológica e econômica. Participam de vários processos que são essenciais à vida na Terra, como reconhecimento celular e a transformação de polissacarídeos, de importância nutricional fundamental para muitos organismos, em moléculas menores, como amido, celulose e quitina (PETERSEN, 2010). A primeira glicosilhidrolase caracterizada tridimensionalmente foi a lisozima da clara de ovo de galinha (*Hen egg-white lysozyme* – HEWL) (BLAKE et al., 1965).

Devido ao fato de enzimas que se ligam a açúcares apresentarem a capacidade de encaixe para os resíduos que formam esses carboidratos em distâncias apropriadas que pode influenciar na sua atividade hidrolítica, um sistema de nomenclatura baseado na posição de subsítios foi adequado para as GHs, onde foram respeitadas a posição dos subsítios em relação ao local de quebra do carboidrato e a possibilidade de adição de

outras possíveis unidades glicosídicas nas porções redutoras e não-redutora. Portanto, os subsítios são nomeados por convenção de $-n$ a $+n$, onde n representa o número do subsítio específico, e o ponto de clivagem da carboidrato pela enzima é representado pelos subsítios -1 e $+1$, sendo -1 a extremidade não-redutora e $+1$ a extremidade redutora do açúcar (DAVIES; WILSON; HENRISSAT, 1997).

As GHs possuem dois mecanismos gerais para sua atividade catalítica (Figura 1), que retém ou invertem a configuração do oxigênio anomérico durante a catálise. Ambos os mecanismos geralmente são auxiliados por resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico do sítio catalítico da enzima. No mecanismo de retenção, inicialmente o resíduo do sítio ativo da enzima que funciona como nucleófilo estabelece uma ligação covalente com o carbono anomérico do carboidrato, ao mesmo tempo que outro resíduo catalítico ácido/base doa prótons para o oxigênio pertencente a ligação glicosídica. Posteriormente, o grupo doador de prótons coordena o ataque nucleofílico de uma molécula de água, formando o produto, o que libera o sítio ativo. Já o mecanismo de inversão, ocorre de modo mais simples, onde um grupo carboxilato da enzima doa prótons para o oxigênio da ligação glicosídica, enquanto ocorre um ataque nucleofílico ao carbono anomérico do resíduo de açúcar (PETERSEN, 2010; VUONG; WILSON, 2010).

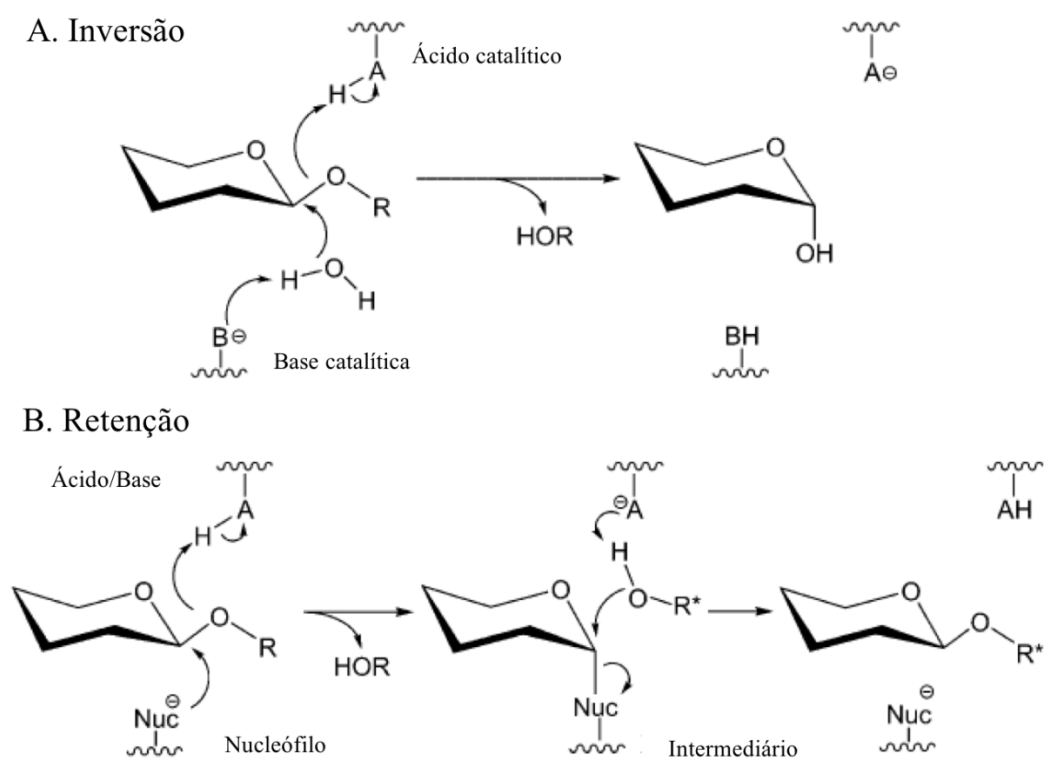
Das glicosil hidrolases de importância em vários processos na natureza, existem as quitinases, pertencentes as famílias GH18 e GH19, já bastante conhecidas e bem caracterizadas como proteínas com potencial antifúngico.

2.2.1 Quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas pertencentes principalmente as famílias GH 18 e 19, que hidrolisam ligações covalentes β -1,4 entre os resíduos de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc,) que formam as cadeias de quitina (HENRISSAT; BAIROCH, 1993; KOPPARAPU et al., 2011).

Essas enzimas são amplamente conhecidas e bem caracterizadas, possuindo potencial biotecnológico com diferentes utilidades. Quitinases são encontradas envolvidas em vários eventos na natureza, dentre os quais destacam-se a remodelagem do arcabouço de quitina no exoesqueleto de artrópodes, durante os períodos de crescimento e desenvolvimento (ecdise) (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; FUNKHOUSER; ARONSON, 2007) e em certos gêneros de bactérias, na transformação da quitina insolúvel em metabólitos e fontes de nutrientes, bem como na defesa contra

Figura 1 – Esquema dos mecanismos gerais de catálise de glicosilhidrolase (GHs)



A. Mecanismo por inversão da configuração dos produtos anôméricos; B. Mecanismo por retenção da configuração dos produtos anôméricos.

Fonte: VUONG; WILSON, 2010 com adaptações.

patógenos (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). Diversas funcionalidades já são encontradas na natureza para a atividade dessas enzimas, bem como para os compostos formados a partir da degradação da quitina (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015).

As quitinases da família GH 18 possuem uma arquitetura conservada, geralmente apresentando multidomínios, podendo conter regiões de peptídeo sinal, domínios de ligação a quitina, regiões catalíticas e domínios contendo repetições do tipo serina/treonina. Sua região de catálise é caracterizada por possuir um dobramento do tipo barril TIM (triose fosfato isomerase), contendo 8 pares de alfa hélices/folhas beta. Um resíduo de ácido glutâmico é bastante característico nessas enzimas e pode estar presente no domínio catalítico. Na falta deste, pode ocorrer uma baixa atividade enzimática. Alguns destes domínios acessórios podem auxiliar na catálise enzimática, como por exemplo na catálise de substratos insolúveis, que pode ocorrer com o auxílio do domínio de ligação à quitina. Já alguns domínios podem auxiliar na estabilidade da proteína, como a porção rica em serina/ treonina que provavelmente atua como sítio de glicosilação, estabilizando a estrutura da proteína na presença de proteases (HUANG *et al.*, 2011). Acredita-se que a função primordial das quitinases pertencentes a família GH 18 seja de clivagem das cadeias de quitina, porém várias outras atividades foram descritas para este grupo de proteínas (HUANG *et al.*, 2012).

Quitinases da família GH 18 são encontradas amplamente em todos os grupos de organismos: arqueas, bactérias, fungos, mamíferos e plantas (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015). O mecanismo de catálise das GHs 18 baseia-se na retenção da conformação do monossacarídeo liberado na reação (β -anômero), também chamada de catálise substrato-assistida (PERRAKIS *et al.*, 1994; TERWISSCHA VAN SCHELTINGA *et al.*, 1995).

Já os membros da família GH 19 são conhecidos por apresentarem um dobramento com alto conteúdo de alfa hélices, apresentando no domínio catalítico um dobramento do tipo lisozima, sendo encontradas em alguns grupos restritos de organismos como vegetais superiores, algumas espécies de bactérias, nematódeos e vírus (UDAYA PRAKASH *et al.*, 2010). Apresentam mecanismo de catálise do tipo ácido-base, com inversão da conformação dos resíduos de N-acetil-D-glucosamina liberado (α -anômero) (ISELI *et al.*, 1996).

Enzimas quitinolíticas estão envolvidas em vários processos na natureza, tais como no mecanismo de defesa de plantas a diversos patógenos, como proteínas

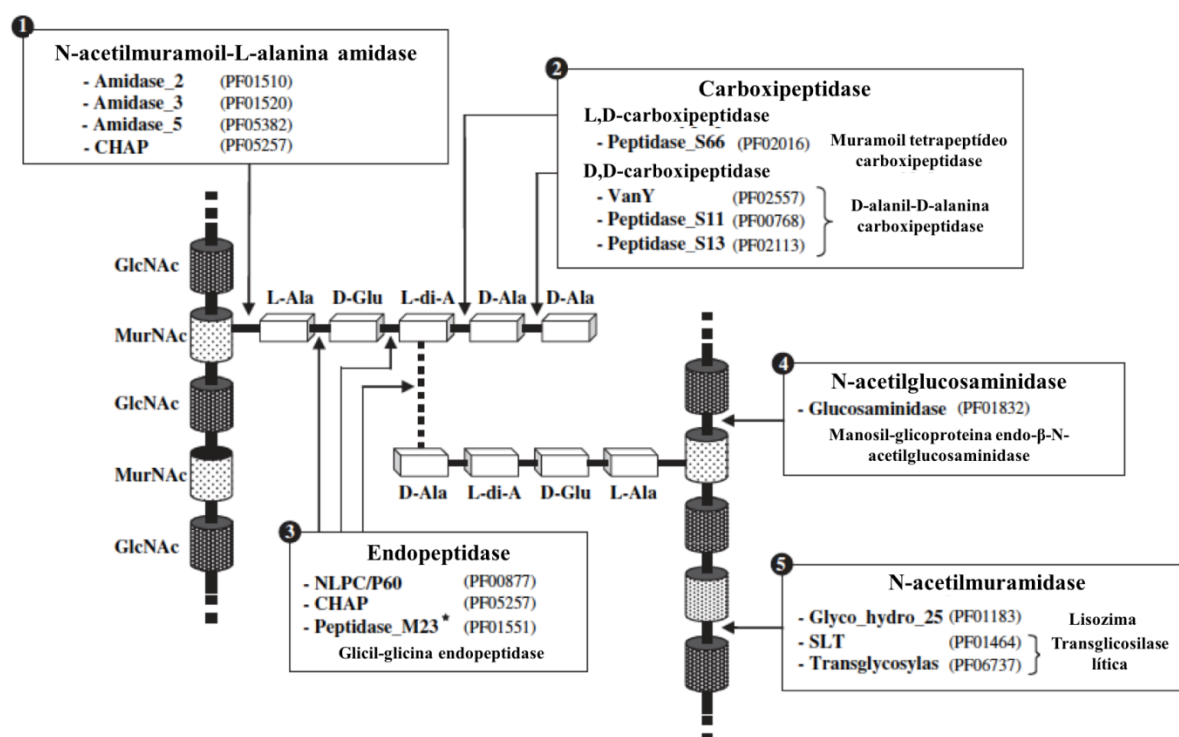
relacionadas a patogênese (PR); no processo de ecdise (muda) de artrópodes, na degradação do exoesqueleto de quitina. Outros usos incluem a utilização na cadeia industrial para produção de compostos derivados de quitina, com diversas aplicações. Dentro do aspecto farmacológico, quitinases são utilizadas em processos onde são necessários produtos oriundos da degradação da quitina, como suportes membranáceos no sistema de entrega de fármacos, ou no combate a células cancerosas, induzindo lise celular (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015).

Quitinases são exemplo de enzimas com potencial de clivar ligações entre monômeros de carboidratos, apresentando um potencial antifúngico já classicamente conhecido e relatado. Porém outras enzimas possuem também potencial na clivagem de ligações glicosídicas entre outros tipos de glicanos, podendo apresentar assim outras atividades, como antibacteriana. Destas, podemos citar de modo genérico as peptidoglicanos hidrolases, capazes de clivar vários tipos de ligações que ocorrem entre os resíduos formadores da molécula de peptidoglicano, principal componente da parede celular bacteriana.

2.3 Peptidoglicano Hidrolases (PHs)

Peptidoglicano hidrolases (PHs) são enzimas bacterianas capazes de clivar moléculas de peptidoglicanos, e dessa forma, importantes no metabolismo bacteriano relacionado aos processos de lise e crescimento celular. Estas enzimas podem ocorrer em diversas classes de organismos, com similaridade em relação a sua estrutura e função. Comumente podem ser classificadas em lisozimas, autolisinas, bacteriocinas e endolisinas (MALINIČOVÁ et al., 2010). Com relação à especificidade por um tipo de substrato, podem ser divididas em glicosidases (n-acetilglucosaminidases e n-acetilmuramidases), peptidases (carboxipeptidases e endopeptidases), e amidases (n-acetilmuramoli-L-alanina amidase) (VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008) (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura esquemática de um peptidoglicano de um organismo Gram-positivo e os sítios de catálise das peptidoglicano hidrolases (PHs)



GlcNAc: N-acetilglucosamina; MurNAc: ácido N-acetilmurâmico; L-Ala: L-alanina; D-Glu: D-glutamato; L-di-A: ácido mesodiaminopimérico.

Fonte: (LAYEC; DECARIS; LEBLOND-BOURGET, 2008)

O filo bacteriano Firmicutes possui uma grande quantidade de diferentes de PHs, onde a especificidade pelo tipo de clivagem depende da arquitetura do sítio catalítico dessas enzimas, porém existem PHs com possibilidade de clivagem em mais de um tipo de ligação na molécula de peptidoglicano, com o mesmo domínio catalítico (domínio VanY, por exemplo). No domínio CHAP (amidohidrolase/peptidase dependente de cisteína e histidina) duas funções diferentes são reportadas envolvendo tanto separação das células filhas na divisão celular (N-acetilmuramoil-L-alanina amidase) quanto no processo de lise celular (endopeptidase) (LAYEC; DECARIS; LEBLOND-BOURGET, 2008).

As enzimas com capacidade de degradação de peptidoglicanos podem apresentar várias funções nas áreas da saúde, biotecnologia e industrial, como serem alternativas a antimicrobianos, cosmético e produtos farmacêuticos, facilitadores do processo de lise celular para obtenção de produtos recombinantes produzidos no meio intracelular e no biocontrole na indústria de alimentos (MALINIČOVÁ et al., 2010).

A busca por enzimas com atividades antimicrobianas é um dos alvos na pesquisa a novos fármacos. Uma das facilidades é o advento do sequenciamento de genomas de organismos, que ampliou a gama de opções na investigação de novas proteínas com esse potencial. Dentre os organismos com genoma completamente sequenciado e de importância biotecnológica está *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria encontrada em diversos ambientes e com grande poder adaptativo. Além disso, esta é responsável pela produção de várias enzimas com potencial biotecnológico, como quitinases.

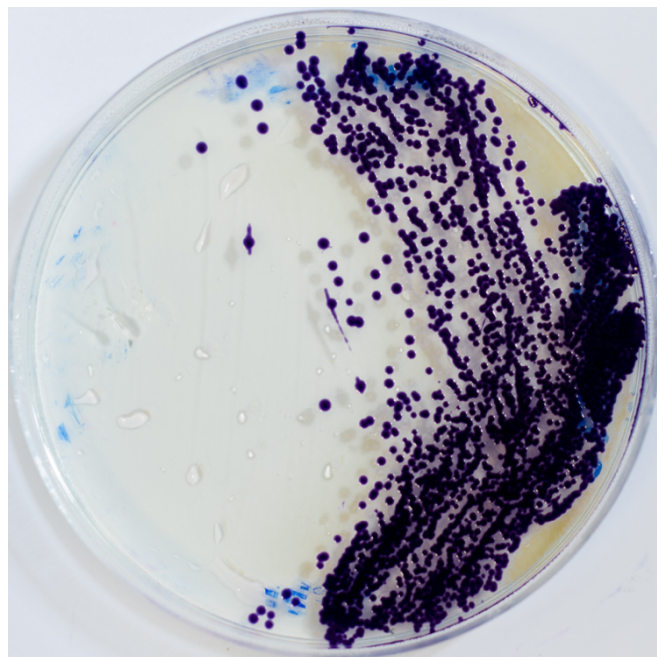
2.4 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é uma betaproteobactéria Gram-negativo, oxidase-positiva, anaeróbia facultativa, pertencente à ordem Neisseriales e família Chromobacteriaceae. É saprófita, de vida livre, sendo comumente encontrada em ambientes aquáticos, em condições estuarinas ou marinhas (MCAULIFFE; HENNESSY; BAIRD, 2015). No Brasil foi encontrada habitando as águas do Rio Negro, na Amazônia (DURÁN; MENCK, 2001) (Figura 3).

Segundo Yang e Li (2011), *C. violaceum* pode atuar como possível patógeno oportunista causando septicemia em humanos, tendo encontrado somente 106 casos a

partir de buscas em diferentes bases de dados da literatura entre os anos de 1952 e 2009. Segundo os autores, 80% dos casos foram relatados em homens, tendo a infecção apresentado média de duração de 7 a 18 dias. Fatores como trauma, exposição a elementos ambientais como solo e água foram considerados como predisposição a infecção por esta bactéria. Cloranfenicol foi o antibiótico de escolha no tratamento, apesar de em muitos casos agentes terapêuticos foram usados em combinação, principalmente após a década de 90, onde ciprofloxacino e carbapenem foram incorporados a terapêutica a infecção por *C. violaceum*.

Figura 3 – Aspectos morfológicos das colônias de *Chromobacterium violaceum* cultivadas em ágar Lennox (ágar)



Fonte: Mayara Azevedo (2017)

Martinez e Mattar (2007) relataram um caso de septicemia fatal em uma criança de 4 anos, oriunda da zona rural colombiana, que apresentava um quadro de febre, anorexia, vômito e dor abdominal há 4 dias. Após investigações laboratoriais e anamnese, colônias violetas de um bacilo Gram-negativo foram isoladas a partir do sangue do paciente. Esse bacilo foi identificado como *C. violaceum* susceptível a vários antimicrobianos, porém apesar da terapia ter se iniciado rapidamente, o paciente veio a

óbito no quinto dia de infecção. Sabe-se que casos de contaminação por *C. violaceum* podem causar abscessos hepáticos, lesões na pele, fascite necrosante e linfadenite (AROSIO et al., 2011; MARTINEZ; MATTAR, 2007; SEIGEL et al., 2012).

Um ponto relevante em relação à importância de *C. violaceum* é a produção de um metabólito secundário chamado violaceína, um pigmento de coloração púrpura obtido a partir da fusão de duas moléculas de L-triptofano. Sua produção pode variar de acordo com a localização onde a bactéria foi isolada. A produção de violaceína não está restrita somente a bactérias do gênero *Chromobacterium*, sendo encontrada, dentre outras espécies, em *Janthinobacteria* sp. e *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. Esta molécula apresenta diversas atividades biológicas já relatadas, como atividade antiparasitária, antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora, bem como atividades com potencial aplicação industrial (DURÁN et al., 2016).

Este metabólito secundário, a violaceína, é um dos envolvidos no mecanismo de *QuorumSensing* (QS) de *C. violaceum*, onde espécies de bactérias mantêm um sistema de sinalização dependente da densidade celular, em que pequenas moléculas sinalizadoras são produzidas e se acumulam, sinalizando de forma sincronizada, respostas nos níveis de expressão gênica para a manutenção das populações (LI; NAIR, 2012). Outros metabólitos já foram relatados sendo produzidos por *C. violaceum*, como antimicrobianos, cianeto de hidrogênio e exonucleases que estão envolvidas no mecanismo de síntese de violaceína. Além desses metabólitos, outras moléculas importantes foram encontradas sendo produzidas por *C. violaceum*, tais como ferrioxamine E, um potencial fator de crescimento, potencializadores de antimicrobianos, outros metabólitos com potencial atividade antimicrobiana e antitumoral, polissacarídeos não comuns, homopolíésteres, dentre outros (DURÁN; MENCK, 2001).

O sequenciamento do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 mostrou sequências para vias alternativas de geração de energia, ORFs relacionadas ao transporte, adaptação ao estresse e à mobilidade. Regiões que codificam para proteínas relacionadas a patogênese também foram encontradas. Seu genoma é de 4.751.080 pb, compreendido em um único cromossomo circular, com 4.431 ORFs (DE VASCONCELOS et al., 2003). Em muitos desses produtos gênicos, vê-se um grande potencial biotecnológico, no que se refere ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (CASTRO et al., 2015). Destes produtos, destacam-se as quitinases produzidas por *C. violaceum* que podem estar envolvidas em processos relacionados a obtenção de fontes de carbono para nutrição microbiana e nos mecanismos de defesa com atividades antimicrobianas.

O sequenciamento do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472, também encontrou sequências codificantes para quitinases [CV2736, CV1897, CV3316, CV2935, CV4240]. A partir de dados de bioinformática, a similaridade entre as sequências de aminoácidos predita, bem como estrutural, foi visto que *C. violaceum* possui quitinases pertencentes as famílias GH 18 e GH 19, com algumas possuindo ou não domínio de ligação à quitina, massa molecular variando de 33,7 a 84,5 kDa e pI teórico variando de 5,17 a 8,88 (DE VASCONCELOS et al., 2003).

2.5 rCV2736

Em um trabalho anterior, rCV2736 foi caracterizada como uma *Chitinase-like*, da família 18 das glicosil hidrolases (GH18), que apresenta 315 aminoácidos codificados por uma ORF de 915 pb do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472. Através da análise da sequência, foi observado que esta quitinase possui um único domínio catalítico (resíduos de 16 a 305) em sua estrutura primária, não possuindo qualquer outro domínio acessório, como domínio de ligação à quitina, segundo análises *in silico*. Apresenta massa molecular e pI teórico, calculados com base na sequência de aminoácidos, de 33.743,6 Da e 5,32, respectivamente. Esta proteína foi produzida de forma heteróloga (rCV2736) em células da levedura *Pichia pastoris* KM71H, utilizando o plasmídeo de expressão pPICZ α A, sendo então secretada para o meio de cultura com auxílio do fator de secreção de *Sacharomyces cerevisiae* presente no plasmídeo de expressão (MEDEIROS, 2012).

Em ensaios utilizando quitina coloidal como substrato, rCV2736 apresentou baixa atividade quitinolítica, quando comparada a quitinases já descritas na literatura (MEDEIROS, 2012). Esta proteína também apresentou possíveis sítios de glicosilação. Resultados preliminares também apontaram uma possível atividade antibacteriana em ensaios utilizando uma fração protéica enriquecida da enzima recombinante (rCV2736) (MEDEIROS, 2012).

Além disso, foi observado que os aminoácidos encontrados na sequência do seu sítio catalítico diferem do padrão comumente encontrado em outras quitinases de *C. violaceum*. A sequência de aminoácidos de rCV2736 apresentou similaridade significativa com proteínas classificadas na subfamília *CFLE* (*Cortical fragment-lytic*

enzyme) da super-família *Chitinase-like*, incluindo por exemplo uma hidrolase de *Bacillus cereus*, relacionada ao processo de esporulação (PHs), devido a sua atividade lítica sobre o peptídeoglicano da parede celular do esporo, auxiliando no processo de germinação do esporo (VOLLMER et al., 2008b).

Portanto, devido à similaridade estrutural com proteínas relacionadas ao processo de esporulação e a possível atividade antibacteriana desta proteína, especula-se que rCV2736 seja uma potencial molécula com atividade antimicrobiana contra patógenos de importância médica e agroindustrial, sendo necessárias maiores investigações relacionadas ao real papel biológico e biotecnológico desta molécula.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da proteína recombinante de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, rCV2736, como um antimicrobiano, a partir de sua sequência original (CV2736), expressa em *Pichia pastoris* KM71H, bem como determinar seu mecanismo de ação através de ferramentas de biologia computacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir de forma recombinante em células de *Pichia pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736 e purificar a rCV2736;
- Caracterizar parcialmente a rCV2736 por determinação da sua sequência N-terminal e análise de glicanos por espectrometria de massas e reações de deglicosilação;
- Investigar a atividade quitinolítica da rCV2736, em diferentes condições;
- Investigar a atividade hidrolase de peptidoglicano da rCV2736;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima da rCV2736;
- Investigar efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade bacteriana;
- Investigar o efeito da alteração de pH na atividade antimicrobiana da rCV2736;
- Investigar efeito modulador da rCV2736 na atividade de antimicrobianos de uso clínico;
- Investigar a atividade antibiofilme da rCV2736;
- Investigar a atividade antiparasitária da rCV2736;
- Investigar a Hemotoxicidade da rCV2736;
- Construir um modelo estrutural tridimensional válido de rCV2736 e investigar o mecanismo de ação por simulação de *Docking molecular*.

4 MATERIAL

4.1 Cepas de bactérias e leveduras

O clone da levedura *Pichia pastoris* KM71H (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) transformado com o plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV2736 foi cedido pelo professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As bactérias utilizadas nos ensaios: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 encontram-se mantidas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) da UFC, coordenado pela Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

Os experimentos de biologia molecular e microbiologia foram realizados no LABGEM e LabMicro, respectivamente, sob a supervisão de seus coordenadores.

4.2 Linhagens celulares

Os experimentos de atividade antiparasitária *in vitro* foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças tropicais, sob a supervisão da profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, bem como a obtenção das células de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) nas formas epimastigotas e tripomastigotas.

4.3 Enzimas e demais reagentes

A enzima utilizada para determinação da atividade quitinásica, β -glucuronidase de *Helix pomatia* tipo HP-2, foi obtida da Sigma-Aldrich.

A enzima tripsina, utilizada para espectrometria de massas foi obtida da GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).

N-glicosidase F recombinante, de *Flavobacterium meningosepticum* O-glicosidase de *Streptococcus pneumoniae* foram adquiridas da Roche Applied Science (Mannheim, Germany).

O antimicrobiano Zeocina utilizado para manutenção do clone recombinante de *P. pastoris* KM71H foi adquirido da empresa Invivogen (San Diego, CA, EUA).

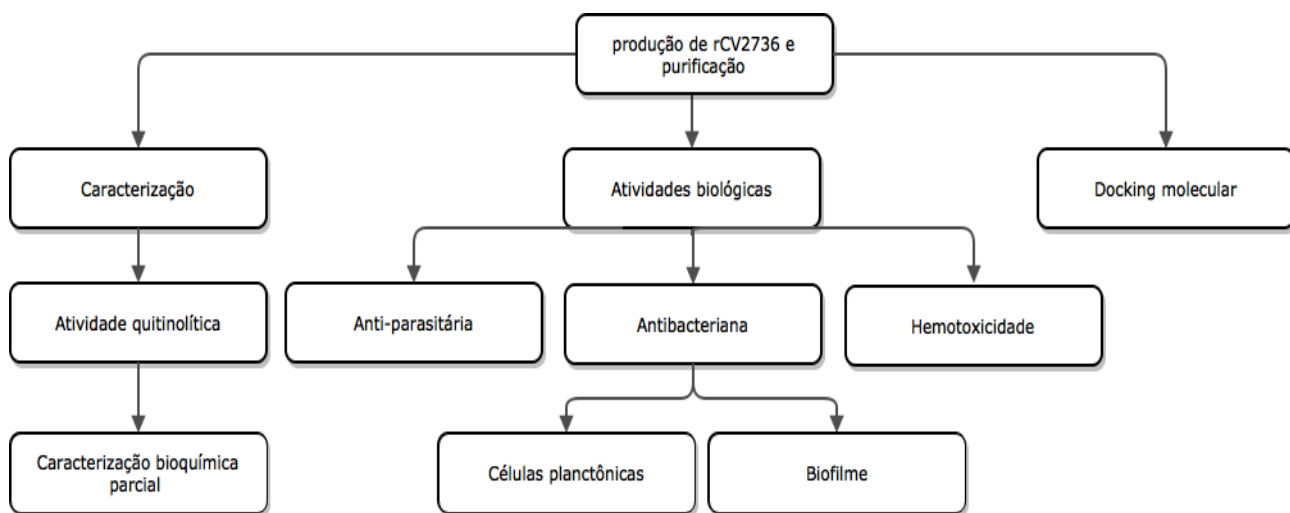
Os meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos, bem como para produção da proteína recombinante foram adquiridos das empresas Oxoid, Himedia e Merck.

Os antimicrobianos utilizados nos ensaios microbiológicos foram obtidos da empresa Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Kit com marcador de massa molecular para eletroforese SDS-PAGE eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (*Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis*) foi obtido da GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).

Os demais reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico e adquiridos de empresas locais.

5 MÉTODOS

Figura 4 – Fluxograma do desenho experimental das etapas do trabalho



Fonte: elaborado pela autora.

5.1 Aspectos éticos

O presente trabalho não necessita de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), conforme a Resolução 196/96 da CNS-MS. Devido a *C. violaceum* ATCC 12472 não ser uma cepa que faz parte do patrimônio genético brasileiro, por ter sido coletada na Malásia, não há necessidade de cadastro deste trabalho no banco de dados do SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado).

Todos os experimentos em que foram utilizadas manipulação de material genético, bem como manipulação de cepas recombinantes foram realizados no Laboratório de Genética molecular da Universidade Federal do Ceará, estando autorizado pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), por meio do CQB (certificado de Qualidade em Biossegurança) 0105/99 (publicado no Diário Oficial da União Nº 76-E de 23/04/1999, Seção 3, página 04), a realizar experimentos em regime de contenção, com organismos geneticamente modificados do grupo I.

5.2 Produção da proteína recombinante (rCV2736) a partir de células de *Pichia pastoris*KM71H::pPICZ α A::CV2736

A produção da proteína recombinante foi realizada de acordo com o manual do fabricante do kit de expressão *Pichia Expression Kit* (Invitrogen), onde uma colônia isolada, selecionada em ágar YPDS (*Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol*) contendo Zeocina 500 $\mu\text{g/mL}$, foi inoculada em caldo BMGY (*buffered complex glycerol medium*), com o mesmo antibiótico, e incubada a 30 °C, sob agitação orbital (200 rpm) até atingir $\text{OD}_{600} = 10$. As células foram então coletadas por centrifugação (3.000 x g, 5 min, 4 °C) e ressuspendidas em caldo BMMY (*buffered complex metanol medium*), acrescido de metanol, de modo a se obter uma $\text{DO}_{600} = 1,0$. A cultura foi incubada nas mesmas condições anteriormente e metanol P.A. foi adicionado, a cada 24 h, para uma concentração final de 1% (v/v). A indução foi realizada por um período de até 96 h. O sobrenadante da cultura foi coletado (3.000 x g, 5 min, 4 °C) e o meio de cultura livre de células foi dialisado exaustivamente contra água destilada, usando uma membrana de celulose com limite de exclusão de 12,4 kDa. Ao material dialisado foi adicionado sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ sólido para 95% de saturação. A mistura ficou em repouso por, no mínimo, 4 h sendo então centrifugada a 12.000 x g, por 20 min, a 4 °C. O precipitado, denominado fração 0/95 (F0/95) foi ressuspendido em um pequeno volume de tampão acetato de sódio 50mM pH5,2 e armazenado a -20 °C até uso posterior.

Os ensaios para caracterização da atividade enzimática de rCV2736 foram realizados utilizando a fração proteica total, que continham todas as isoformas da proteína recombinante, bem como outras proteínas remanescentes do processo de produção. Os demais ensaios foram realizados utilizando a fração cromatográfica contendo todas as isoformas de rCV2736 purificadas (Figura 4).

5.3 Purificação da proteína recombinante (rCV2736)

Três métodos cromatográficos foram testados para a purificação de rCV2736: Cromatografia de afinidade em sefarose com metal imobilizado, cromatografia de afinidade em matriz de quitina e cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenyl sepharose.

A cromatografia de afinidade em sefarose com metal imobilizado foi realizada utilizando utilizando matrizes contendo níquel, cobalto ou cobre imobilizados

em matriz de sefarose (GE healthcare), utilizando a fração proteica obtida com saturação a 95% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de acordo com o item 5.2. A fração foi dialisada exaustivamente contra tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,005 M de imidazol. A matriz foi equilibrada no mesmo tampão e as frações cromatográficas eluídas com 0,05, 0,1, 0,25 e 0,5 M de imidazol. Já para a cromatografia de afinidade em matriz de quitina (Sigma), a fração foi dialisada exaustivamente contra tampão acetato de sódio pH 5,2 e a matriz equilibrada no mesmo tampão. As frações cromatográficas foram eluídas com 0,1 e 0,5 M de ácido acético. Após ambas as cromatografias, as frações foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e bandas proteicas visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo (LAEMMLI, 1970).

Já para a cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenyl sepharose CL4B (GE Healthcare), a fração foi dialisada exaustivamente contra tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M. A matriz foi equilibrada no mesmo tampão e as frações cromatográficas eluídas com tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo concentrações decrescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2, 1,0, 0,9, 0,6 e 0,3 M). O fluxo utilizado no sistema foi de 1 mL/min e o volume de coleta das frações foi de 3 mL/tubo. As frações foram dialisadas exaustivamente contra água destilada. As proteínas foram concentradas por precipitação utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com saturação a 95% e as bandas proteicas visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo (LAEMMLI, 1970).

5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A migração eletroforética das proteínas foi realizada segundo protocolo de Laemmli (1970), com modificações. Uma malha de poliacrilamida com 2 mm de espessura foi polimerizada num sistema composto por um gel de separação na parte inferior (Acrilamida 15% (m/v), SDS 1% (m/v), Tris-HCl 3 M pH 8,8) e um gel de concentração na parte superior (Acrilamida 3,5% (m/v), SDS 1% (m/v), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8). As amostras, antes de serem submetidas a corrida, foram misturadas a tampão de amostra para SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,001% (m/v) e aquecidas a aproximadamente 100 °C por 10 min. As corridas foram realizadas mantendo voltagem constante de 120 V, em tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, Glicina 0,192 M,

SDS 0,1% (m/v)), num sistema vertical. As bandas proteicas foram reveladas por coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1%, preparado em metanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), e descoradas com isopropanol 12,5% (v/v) em ácido acético 10% (v/v). As massas moleculares aparentes das bandas proteicas foram mensuradas pelo software de captura de imagens E-capt (Vilber Lourmat).

5.5 Caracterização bioquímica parcial de rCV2736

5.5.1 Sequenciamento da porção N-terminal da proteína recombinante

O seqüenciamento da porção N-terminal da proteína recombinante, referente à banda com maior massa aparente vista a partir da SDS-PAGE (41,2 kDa), foi realizado através da reação de degradação de Edman (EDMAN, 1949), utilizando o sequenciador automático de proteínas Shimadzu, modelo PPSQ-213, sob condições fornecidas pelo fabricante. A fração do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736 precipitada a 95% de saturação com sulfato de amônio, foi submetida a SDS-PAGE, e a partir das proteínas presentes no gel, foi realizada a eletrotransferência para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro de 0,45 μ M, em sistema TE 70 Semidry Transfer Unit (GE Healthcare). A membrana foi tratada com metanol 100% por alguns segundos, corada com o corante *coomassie brilliant blue R-250* 0,1% (m/v), metanol 30% e ácido acético 10% (v/v) e descorada em solução de metanol 40% e ácido acético 10%. A banda de rCV2736 foi excisada da membrana e após completamente descoradas, os pedaços das membranas foram lavados e mantidos em água ultra pura até o momento do sequenciamento.

5.5.2 Reação de deglicosilação com as enzimas N-glicosidase e O-glicosidase

Devido à proteína recombinante se apresentar sob três bandas proteicas com diferentes massas moleculares aparentes após SDS-PAGE, reações de digestão com as enzimas N-glicosidase F, recombinante, de *Flavobacterium meningosepticum* e O-glicosidase de *Streptococcus pneumoniae* (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) foram realizadas utilizando-se a fração cromatográfica, a qual continha as bandas referentes às isoformas da proteína recombinante rCV2736 puras, com o propósito

de se detectar se as diferentes massas moleculares seriam devidas a possíveis glicosilações existentes na proteína.

Para isto, as reações foram realizadas de acordo com o manual do fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), utilizando-se cada enzima separadamente, bem como combinadas (3U de N-glicosidase F e 3,75 mU de O-glicosidase). Em cada reação foram adicionados 15 µg de proteína, previamente dialisadas contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2. As reações foram feitas em um volume final de 60 µL.

A proteína contida na reação foi desnaturada na presença de SDS 0,1% e aquecidas à 100 °C por 5 min. Posteriormente foi adicionado Triton X-100 1% para que o SDS não realizasse a desnaturação das deglicosilases. As reações foram incubadas por 18 h a 37 °C e o processo de deglicosilação foi visualizado através de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

5.5.3 Espectrometria de massas

De modo a analisar se rCV2736 foi expressa em *Pichia pastoris* KM71H em diferentes isoformas, foi realizada espectrometria de massas a partir da excisão das bandas protéicas do gel de poliacrilamida, equivalente às 3 possíveis isoformas com diferentes massas moleculares visualizadas após SDS-PAGE de rCV2736 (SHEVCHENKO et al., 2006).

Os pedaços de gel foram descorados com solução de Acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,8 e desidratados em Acetonitrila 100%. Esta foi removida e os pedaços de gel foram secos em centrífuga a vácuo (Eppendorf). O material foi reduzido na presença de 0,1 mL de Ditioneitol (DTT) 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 min, a 56 °C em banho-maria, e alquilados com 0,1 mL de Iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 min a temperatura ambiente e no escuro. O material foi lavado três vezes com 0,2 mL de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 min e desidratado com 0,2 mL de acetonitrila 100%, por 5 min. Após secos em centrífuga a vácuo, esses foram digeridos com tripsina a 37 °C.

Após a digestão, os peptídeos foram extraídos por sonicação em ultrassom (Eppendorf) por 10 min e em seguida submetidos ao vórtex por 20 s. O sobrenadante foi removido para outro tubo e os fragmentos de gel lavados duas vezes com ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. A solução utilizada na lavagem foi removida e acumulada em

outro tubo. O material final foi centrifugado a 14.000 rpm, 30 s, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi concentrado e os peptídeos analisados por espectrometria de massas pela técnica de ionização por eletropulverização (*electrospray*), em espectrômetro Synapt HDMS ESI-Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA).

Os dados foram analisados através do *software online* Mascot (<http://www.matrixscience.com>) para identificação das proteínas encontradas nos *spots* e análises das massas dos peptídeos obtidos.

5.5.4 Determinação da Atividade quitinásica da rCV2736

O ensaio colorimétrico foi realizado segundo Boller (1992) e o preparo da quitina coloidal seguiu Molano e colaboradores (1977), que consistiu em incubar a fração proteica total, que continham todas as isoformas da proteína recombinante rCV2736 bem como outras proteínas remanescentes do processo de produção (250 μ L) com quitina coloidal 1% (m/v) (250 μ L) a 37 °C, por 1 h, com agitação constante. A reação foi parada por aquecimento em banho-maria à 100 °C por 8 min. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 13.000 rpm, por 15 min, a 25 °C, e o sobrenadante (300 μ L) transferido para novo tubo, contendo a enzima β -glucuronidase de *Helix pomatia* tipo HP-2 (Sigma-Aldrich) (13,2 U). Como controle, foi feita uma reação sem a adição da fração proteica contendo a quitinase recombinante, que foi substituída por tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2), com a adição de substrato. A reação com β -glucuronidase foi incubada a 37 °C por 1 h e então interrompida por fervura em banho-maria por 6 min. Após resfriamento, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 (100 μ L) e tetraborato de potássio 0,6 M (190 μ L) foram acrescentados à mistura, novamente aquecida por 5 min. Após resfriamento em banho de gelo, 1 mL de uma solução de p-dimetilaminobenzaldeído [DMAB 10% (m/v)] preparado em ácido acético contendo 12,5% de ácido clorídrico (HCl) 11,5 M diluída 1x em ácido acético PA foi adicionada à mistura.

A leitura das absorbâncias foi feita a 585 nm e para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação foi utilizada uma curva padrão construída a partir de diferentes concentrações de N-acetil-D-Glucosamina (GlcNAc), variando de 100 a 1.000 μ M (REISSIG et al., 1955). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc por 1 mL em 1 h, sob as

condições acima descritas. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM de triplicatas.

5.5.4.1 Efeito do tempo de incubação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal

Para avaliar se o tempo de incubação com o substrato influenciaria num aumento ou diminuição da atividade quitinásica da proteína recombinante, foi realizado o ensaio de atividade quitinásica, segundo Boller (1992) com modificações. A fração proteica total, que continha todas as isoformas da proteína recombinante rCV2736 bem como outras proteínas remanescentes do processo de produção foi incubada por 1 h e 24 h, de acordo com o item 5.5.4. Como branco da reação, foi utilizado somente tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 juntamente com o substrato. Após o ensaio, a atividade quitinásica total foi calculada considerando uma unidade de atividade enzimática (U) a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc por 1 mL em 1 h e 24 h, sob as condições acima descritas.

5.5.4.2 Efeito da concentração de NaCl e do tempo de reação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal

A exposição de resíduos hidrofóbicos do domínio catalítico da enzima recombinante pode ser uma maneira de se aumentar a interação com a quitina. Deste modo, para avaliar o efeito do NaCl na atividade quitinásica da rCV2736, as reações foram conduzidas na presença de diferentes concentrações de NaCl (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M e 1M), utilizando quitina coloidal como substrato (item 5.8), de acordo com Boller (1992), com modificações. Como controle, a reação foi realizada sem a presença do NaCl e como branco da reação foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e substrato. O ensaio foi realizado em dois tempos de incubação, 1 h e 24 h, fração proteica total, que continham todas as isoformas da proteína recombinante rCV2736 bem como outras proteínas remanescentes do processo de produção. Após o ensaio, a atividade quitinásica total foi calculada considerando uma unidade de atividade enzimática (U) a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc por 1 mL em 1 h e 24 h, sob as condições acima descritas.

5.5.4.3 Efeito da presença de metais na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal

Para avaliar o efeito da presença de íons metálicos (Ba^{2+} , Sr^{2+} , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ni^{2+} , La^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Rb^+ , Mn^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+}) na atividade quitinásica da proteína recombinante, alíquotas da fração proteica contendo a fração proteica total, que continham todas as isoformas da proteína recombinante rCV2736 bem como outras proteínas remanescentes do processo de produção foram incubadas com a solução 50 mM do íon metálico por 1 h. Após a incubação, as amostras proteicas tratadas foram utilizadas para detecção da atividade quitinásica de acordo com o protocolo descrito no item 5.5.4, com quitina coloidal como substrato. Em alguns casos, algumas amostras apresentaram um grau de desnaturação protéica muito intenso. Por isso, as mesmas foram centrifugadas a 12.000 rpm, 5 min, à temperatura ambiente e o sobrenadante utilizado na atividade. Para não haver interferência dos metais com a atividade da enzima β -glucuronidase utilizada no ensaio, foram adicionados 15 μL de ácido etileno diamino ter-á-acético (EDTA) 100 mM ao sobrenadante, após incubação com o substrato e centrifugação.

5.5.5 Zimografia para detecção da atividade hidrolase de peptidoglicano

Para avaliar se a proteína recombinante possuía atividade sobre peptidoglicanos encontrados na parede celular bacteriana foi realizada a técnica de zimografia *in gel*, utilizando-se como substrato células bacterianas, segundo Dufour & Lévesque (2013), com modificações.

No preparo das células bacterianas utilizadas como substrato no gel de poli-acrilamida, culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, crescidas em 3 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por aproximadamente 16 h a 37 °C, foram inoculadas em 300 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C até uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,2. As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g, 10 min, 4 °C, o precipitado de células foi lavado em tampão Tris-Cl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, e ressuscitado em 1 mL de tampão Tris-Cl, 5M, pH 8,8.

Uma alíquota de 1 mL da suspensão de células foi incorporada ao gel de poliacrilamida, onde a eletroforese de proteínas foi realizada segundo Laemmli (1970), com modificações. Para o gel de concentração (porção superior) foram utilizados acrilamida 3,5% e SDS 1% em tampão Tris-Cl 3 M pH 6,8 e para o gel de separação (parte inferior) foram utilizados acrilamida 15 % e SDS 1% em tampão Tris-Cl 3 M pH 8,8. As amostras das frações proteicas fração proteica total, que continham todas as isoformas da proteína recombinante rCV2736 bem como outras proteínas remanescentes do processo de produção foram misturadas a tampão de amostra contendo glicerol (37,5 mM Tris-Cl pH6,8, 3% SDS (p/v), 7,5% Glicerol (v/v), 0,0125% Coomassie blue G-250) e aquecidas a 100 °C por 7 min. Como controle negativo, foi utilizada Albumina Sérica Bovina (BSA) (Fisher Scientific).

Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com 100 mL de água destilada e incubados em tampão de renaturação (20 mM Tris-Cl pH7,4, 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 0,5% (v/v) Triton X-100) por 30 minutos até um tempo máximo de 24 h, à temperatura ambiente para visualização das zonas de degradação do substrato. O gel então foi corado em solução de 0,1% (m/v) de azul de metileno, que revela a atividade positiva através do aparecimento de bandas (zonas) claras.

5.6 Atividade biológica de rCV2736

5.6.1 Determinação da atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre células em crescimento planctônico

5.6.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para os ensaios de atividade antimicrobiana, utilizaram-se culturas de bactérias de *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *K. pneumoniae* ATCC 10031 e *S. choleraesuis* ATCC 10708, e culturas de leveduras *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 750. A CIM foi determinada pelo ensaio de microdiluição, realizado em microplacas estéreis de 96 poços, segundo a norma M7-A6, vol. 23, nº 2 (CSLI, 2003), com modificações. Culturas microbianas, mantidas sob refrigeração, em ágar BHI ou Sabouraud, foram repicadas para caldo BHI para bactérias e Sabouraud para as leveduras e incubadas a 35 °C, por 16 h. Posteriormente, a densidade

das culturas foi ajustada em solução salina 0,9%, de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland, para uma suspensão de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias ou 10^6 UFC/mL para leveduras. Essa suspensão de células foi diluída 100 vezes em caldo Muller Hinton, pH 5,2 para bactérias e caldo Sabouraud para as leveduras, e 5 μ L dessa diluição foram transferidos para cada poço da microplaca. Os poços teste continham 100 μ L de caldo Muller Hinton, pH 5,2 para bactérias e 100 μ L de caldo Sabouraud para as leveduras, e 100 μ L de rCV2736, previamente dialisada exaustivamente contra Tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, para manter a proteína em um valor de pH próximo do seu ótimo com relação a atividade quitinásica (MEDEIROS, 2012), em concentrações que variavam de 0,183 a 365 μ g/mL. Como controle negativo do experimento foi utilizado o antibiótico Amicacina para bactérias e cetoconazol para as leveduras nas concentrações de 0,049 a 100 μ g/mL e como controle positivo do crescimento foi usado meio de cultura contendo o inóculo microbiano utilizado. Três experimentos independentes foram realizados, sendo cada um em triplicata.

As microplacas foram incubadas por 24 h a 35 °C e a inibição do crescimento microbiano foi avaliada a olho nu bem como pela determinação da turvação do meio de cultura com leitura da absorbância a 620 nm de cada poço, de modo a se determinar uma possível turbidez causada pela proteína em contato com o meio de cultura, em leitor de Elisa (BioTek). Considerou-se como CIM a menor concentração de rCV2736 que, a olho nu, foi capaz de inibir completamente o crescimento microbiano. A população microbiana do inóculo inicial foi determinada por contagem em placa após 24 h de incubação a 35 °C, pela técnica da micro-gota (ROMEIRO; ROMEIRO, 2007). Para isso foram inoculadas em placas de ágar *plate count* alíquotas de 5 μ L cada.

Os resultados foram expressos como médias \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$.

5.6.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para obter a CBM, alíquotas de 5 μ L dos poços onde não houve crescimento no ensaio de determinação da CIM foram inoculadas em ágar *plate count* (ROMEIRO; ROMEIRO, 2007). Após 24 h de incubação a 35 °C, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e a CBM foi considerada como a menor

concentração de rCV2736 capaz de matar 99,9% das cepas microbianas testadas (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).

5.6.1.3 Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade das cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031

O efeito do tempo de exposição foi determinado para as cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031, que tiveram seus crescimentos inviabilizados pela rCV2736 nas concentrações testadas (RUKHOLM et al., 2006). Para isso, inicialmente foram obtidas as curvas de crescimento microbiano das duas cepas.

Suspensões microbianas em caldo BHI crescidas a 37 °C por 16h tiveram a densidade celular ajustada em solução salina 0,9%, de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Após diluídas 100 vezes em caldo Muller Hinton, pH 5,5, foram distribuídas nos poços de microplacas e incubadas a 37 °C. A curva de crescimento de cada cepa foi obtida por contagem de colônias em ágar *plate count* após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h pela técnica da micro-gota (ROMEIRO; ROMEIRO, 2007)

Para determinação do efeito do tempo de exposição à proteína recombinante, culturas de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031 foram expostas a concentrações de rCV2736 equivalentes a 1/2xCIM, CIM e a 2xCIM (CLM), em microplacas de 96 poços contendo caldo Muller Hinton, pH 5,5. Para isso, suspensões microbianas com aproximadamente 10⁶ UFC/ml foram preparadas de acordo com item 5.6.1.1. As microplacas foram incubadas a 35 °C e nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h foram coletadas alíquotas e plaqueadas em agar *plate count* para contagem de células viáveis. Como controle do experimento foram utilizadas culturas dos microrganismos testados sem tratamento. O experimento foi realizado em triplicata.

Os resultados foram expressos como médias ± EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com p<0,05.

5.6.1.4 Efeito da alteração de pH na atividade antimicrobiana da rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031

A influência da alteração no pH do meio de cultura na atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031 foi determinada através de ensaio de microdiluição em

microplaca de 96 poços, de acordo com a metodologia descrita no item 5.6.1.1. Suspensões microbianas, com aproximadamente 10^6 UFC/mL, foram obtidas a partir de culturas crescidas em caldo BHI a 35 °C, por 24 h. Nas microplacas foram adicionados 5 µL das suspensões microbianas, 100 µL de caldo Muller Hinton em diferentes valores de pH (5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5) e diferentes concentrações de rCV2736 (0,183 a 375 µg/mL). As microplacas foram incubadas a 35 °C, por 24 h, e após este período, inspecionadas a olho nu para visualização do crescimento bacteriano. Para ajuste do pH do caldo de cultura, foram utilizados HCl 5 M e NaOH 3 M. Como controle do experimento foram utilizadas culturas dos microrganismos testados, nos diferentes valores de pH, sem tratamento (WU et al., 2008). O experimento foi realizado em triplicata.

5.6.1.5 Efeito modulador da proteína recombinante rCV2736 na atividade de antimicrobianos (ATB) de uso clínico

O efeito modulador da rCV2736 na atividade de ATB foi avaliado pelo método de *Checkerboard*, onde diferentes concentrações das substâncias testadas são combinadas como num xadrez (*Checkerboard broth microdilution assay*) (JAYARAMAN et al., 2010). Culturas bacterianas em caldo BHI, incubadas a 37 °C, por 16 h, tiveram sua a densidade celular ajustada em solução salina 0,9%, de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland, para uma suspensão com aproximadamente 10^8 UFC/mL e em seguida foram diluídas 100 vezes em caldo Muller Hinton pH 5,5. Inóculos de 5 µL das culturas foram transferidos para os poços da microplaca. A cada poço da microplaca foram adicionadas associações de diferentes concentrações sub-inibitórias de rCV2736 e ATB (1/2 x CIM, 1/4 x CIM, 1/8 x CIM, 1/16 x CIM), em um volume final de 100 µL, em caldo Muller Hinton, pH 5,5.

As microplacas foram incubadas a 37 °C, por 24 h e avaliadas por inspeção visual da turvação. Para avaliação do efeito modulador foi considerado o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (IFIC):

$$IFIC = FICa + FICb = \frac{[a]}{CIMa} + \frac{[b]}{CIMb}$$

onde, [a] e [b] representam as menores concentrações das substâncias nas associações, FIC representa a Concentração inibitória fracionada e CIM a Concentração Inibitória

Mínima de cada substância utilizada no ensaio. O ensaio foi realizado em triplicata, com duas repetições. Como controle negativo foi utilizado somente caldo Muller Hinton e como controle positivo de crescimento do microrganismo foram utilizadas células não tratadas. A classificação do efeito das associações foi estabelecida como sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), aditivo ou indiferente ($ICIF > 0,5$ e $< 1,0$) e antagonismo ($ICIF \geq 1,0$) (EUCAST, 2003).

5.6.2 Determinação da atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre células microbianas em biofilme

5.6.2.1 Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB)

A CIMB define a menor concentração de proteína recombinante necessária para inibir a formação e o crescimento do biofilme bacteriano. As cepas utilizadas foram classificadas de acordo com o grau de formação de biofilme, através da DO_{590nm} obtida a partir da coloração do biofilme com cristal violeta 0,1 %, onde a $DO_{590nm} < 0,1$ é considerado pobre produtor; $0,1 > DO_{590nm} < 0,5$, produtor e $DO_{590nm} > 0,5$, alto produtor (MALDONADO et al., 2007).

A atividade da proteína recombinante na inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031 foi realizada segundo (DURHAM-COLLERAN e colaboradores (2010), e OVERHAGE e colaboradores (2008), com modificações, e as microplacas foram preparadas de acordo com o item 5.6.1.1. Microplacas contendo caldo Muller Hinton foram preparadas contendo diferentes concentrações de rCV2736 (0,183 a 365 $\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizadas culturas não tratadas com a proteína recombinante. Após 24 h de incubação, sob lenta agitação orbital, a 37 °C, as células planctônicas foram removidas e biofilme formado na microplaca foi lavado com água destilada. A microplaca foi seca em temperatura ambiente e o biofilme fixado em 200 μL de metanol PA. Após a retirada do metanol, o biofilme foi corado e quantificado através de coloração com cristal violeta 0,1% por 10 min, remoção e lavagem das células aderidas à microplaca e secagem. Para quantificação indireta por espectrofotometria da biomassa de biofilme, uma lavagem com 200 μL de ácido acético 33% foi realizada, incubando-se por 10 min para remoção completa do corante preso as células. Este volume foi transferido para uma nova microplaca e lida a

absorbância a 590 nm em leitor de Elisa (ElisaBiotek). O ensaio foi realizado em triplicata. O percentual de inibição do crescimento foi calculado considerando a absorbância do controle positivo do ensaio como 100% de crescimento, de acordo com a fórmula abaixo, onde ICB representa o percentual de Inibição do Crescimento do Biofilme, *Abs [rCV2736]* representa a absorbância de cristal violeta obtida para a concentração de proteína recombinante utilizada e *Abs controle*, a absorbância de cristal violeta do controle positivo para o crescimento do biofilme (poços não tratados com rCV2736):

$$ICB = \frac{Abs [rCV2736] \times 100\%}{Abs controle} \times 100\%$$

Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$.

5.6.2.2 Detecção da concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB)

A CMEB define a menor concentração de proteína recombinante necessária na erradicação do biofilme já formado. O efeito da proteína recombinante rCV2736 na erradicação de biofilme pré-formado foi determinado através da metodologia de DOSLER & KARAASLAN (2014), com modificações. O biofilme foi crescido em microplaca de 96 poços, utilizando 100 μ L de caldo Muller-Hinton, pH 5,5, e 5 μ L de suspensão microbiana (10^6 UFC/mL) de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031, de acordo com o item 5.6.1.1. As microplacas foram incubadas sob agitação orbital lenta a 37 °C, por 24 h. Após este período, o meio contendo as células planctônicas foi aspirado com auxílio de uma pipeta estéril, o biofilme formado nos poços foi lavado com salina estéril (NaCl 0,85%) e a cada poço foram adicionados 100 μ L de caldo Muller Hinton, pH 5,5, contendo concentrações de proteína recombinante que variaram de 182,5 μ g/mL a 730 μ g/mL. Após incubação a 37 °C por 24 h, sob agitação orbital lenta, as células planctônicas foram removidas por aspiração, os poços novamente lavados com salina estéril e 100 μ L de salina foram utilizados para desprender o biofilme remanescente dos poços por raspagem com auxílio de uma ponteira estéril. O material de cada poço foi diluído e plaqueado para contagem das colônias em ágar *Plate Count*. O experimento foi realizado em triplicata.

5.6.3 *Determinação da atividade tripanocida in vitro da proteína recombinante rCV2736*

5.6.3.1 *Sobre a forma epimastigota de Trypanosoma cruzi*

Células na forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram obtidas a partir de cultura em caldo LIT (*liver infusion tryptose*), suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB), incubado a 28 °C, de acordo com protocolo de Camargo (1964). A manutenção das culturas viáveis para estoque foi realizada através de repiques semanais em caldo LIT suplementado nas mesmas condições (KESSLER et al., 2013).

Para avaliação da citotoxicidade da proteína recombinante sobre formas epimastigotas foi seguido o protocolo descrito por Nogueira e colaboradores (2015). Culturas celulares em fase logarítmica de crescimento (sete dias após o repique) foram ajustadas para uma suspensão com concentração de 10⁶ parasitos/mL em microplaca de 96 poços. As culturas foram tratadas com concentrações de rCV2736 variando de 12,5 a 1600 µg/mL, cultivadas e analisadas nos tempos de 24, 48 e 72 h após o tratamento, a 28°C. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas com a proteína recombinante, em tampão fosfato salino (PBS).

A contagem de células viáveis, com motilidade e morfologia preservadas, foi realizada em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata, com três repetições (KESSLER et al., 2013).

A partir da contagem, foi possível determinar a densidade parasitária de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{ parasitos}}{\text{ml}} = n^{\circ} \text{ viáveis} \times 5 \times FC \times FD$$

onde n^o parasitos viáveis expressa o número de células viáveis contadas nos campos da câmara de Neubauer, FC o fator de correção da câmara e FD o fator de diluição. Os valores foram expressos como % de viabilidade celular ± EPM para cada concentração. A partir dos valores obtidos foi possível se determinar a Concentração Inibitória Média (CI₅₀).

5.6.3.2 Sobre a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*

Os parasitos na forma tripomastigota foram cultivados em células LLC-MK2 (*Rhesus monkey kidney*) de acordo com (ADADE e colaboradores (2012), utilizando o meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) contendo 2% de SFB e os antibióticos citados anteriormente. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de CO₂ (5%) controlada, por 5 a 6 dias. Após a eclosão das células, os tripomastigotas foram recuperados por centrifugação (3500 rpm, 7 min) a partir do sobrenadante e utilizados nos ensaios de citotoxicidade da proteína recombinante.

Os tripomastigotas foram cultivados em microplacas de 96 poços, utilizando-se 10⁶ parasitos/mL em meio DMEM contendo 10% de SFB e os antibióticos citados anteriormente, em estufa a 37 °C com atmosfera de CO₂ (5%) controlada. As culturas foram tratadas com concentrações de rCV2736 variando de 6,25 a 400 µg/mL e avaliadas após 24 h de tratamento. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas com a proteína recombinante, em tampão fosfato salino (PBS), sendo considerado 100% de crescimento. A contagem de células viáveis, com motilidade e morfologia preservadas, foi realizada em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata, com duas repetições (KESSLER et al., 2013). A partir da contagem, foi possível determinar a densidade parasitária, de acordo com o item 5.15.1.

5.6.4 Determinação de Hemotoxicidade

A hemotoxicidade da rCV2736 foi determinada utilizando-se uma suspensão de hemácias de carneiro lavadas com solução salina e diluídas para uma concentração final de 1% (v/v) em tampão PBS pH 7,4. 100 µL da suspensão de hemácias foram adicionados a microtubos estéreis juntamente com 100 µL de rCV2736 em concentrações que variavam de 1,12 µg/mL a 575 µg/mL. Após 1h de incubação a 35°C, o sobrenadante foi coletado por centrifugação e a densidade ótica obtida em leitor Elisa (ElisaBiotek) a 570 nm. Como controles negativo e positivo do ensaio foram utilizados tampão PBS e Triton x-100 a 0,1% (v/v), respectivamente. Os resultados foram expressos como médias ± EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com p<0,05.

5.7 Docking molecular

5.7.1 Determinação da estrutura tridimensional da rCV2736 por modelagem molecular por homologia

A estrutura tridimensional de rCV2736 foi obtida com auxílio do servidor *Phyre² – Protein Homology/analogy Recognition Engine v. 2.0* (KELLEY et al., 2015), levando em consideração as propriedades físicas e químicas dos aminoácidos presentes em sua sequência. O *Phyre²* faz uso, inicialmente do banco de dados de estruturas conhecidas de proteínas (SCOP – *Structural Classification of Proteins*), que por sua vez está interfaceado ao banco de dados de estruturas resolvidas (RCSB *Protein Data Bank*). Dentre os modelos obtidos, aquele gerado a partir do molde da proteína relacionada à esporulação (PDB: 3CZ8) de *Bacillus subtilis* foi selecionado, devido a sua confiança (100%) e sua identidade (27%) com os resíduos da rCV2736. Em todas as análises de simulação *in silico* este modelo foi empregado.

5.7.2 Avaliação da qualidade do modelo

Para a análise da qualidade, o arquivo do modelo da rCV2736 em extensão *psd* foi analisado usando o servidor *Molprobit* (CHEN et al., 2010), a partir do gráfico de Ramachandran, que avalia a torção dos ângulos ϕ e ψ dos resíduos de aminoácidos, elegendo regiões permitidas e não-permitidas para o posicionamento desses resíduos na estrutura da proteína (HINTZE et al., 2016). Para esse propósito, também foi usado o servidor *WhatIf* (HOOFT et al., 1996), uma ferramenta capaz de identificar erros (muitas vezes pequeno, mas às vezes catastrófico) em estruturas proteicas (HOOFT, et al., 1996). Para correções de rotâmeros e aminoácidos em posições não-favoráveis ou não-permitidas foi utilizada a ferramenta *Coot* (*Crystallographic Object-Oriented Toolkit*) (EMSLEY et al., 2010). Em seguida, foi minimizada a energia presente no modelo empregando o servidor *Gaia*, nas plataformas *Chiron* (KOTA et al., 2011) e *GalaxyWeb* (KO et al., 2012; SHIN et al., 2014).

5.7.3 Simulação de docking molecular

O *docking* molecular foi realizado com auxílio do *software* Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Para esse propósito, inicialmente foram adicionados todos os hidrogênios não-polares presentes nas moléculas “proteína e ligantes” e, em seguida, o arquivo contendo a estrutura da proteína rCV2736 foi arquivado em extensão *pdbqt* contendo todos os aminoácidos (¹⁰¹FSGINVDFE¹⁰⁹) presentes no sítio catalítico com ligações flexíveis entre seus átomos. Os ligantes [(GlicNac)₄ e (GlcNac-MurNac)₂] também foram arquivados com todas as suas ligações flexíveis e em formatos *pdbqt*. O *docking* realizado foi do tipo sítio dirigido, sendo os parâmetros selecionados: região de ancoragem do ligante (*grid*) com dimensões x, y e z de 40 pts/mapa e 0,553 Å e coordenadas de centro: x = -26.763, y = -0.087 e z = 10.739.

Nas simulações foram geradas 20 saídas de *docking* (pose), aplicando exaustividade de 12 e uma *seed* de 1000. As melhores saídas de *docking* foram selecionadas de acordo com a menor energia, bem como a menor distância possível (Å) de interação entre o resíduo de aminoácido E¹⁰⁹ da proteína rCV2736 e o centro da catálise dos ligantes de acordo com a posição dos subsítios da enzima (DAVIES; WILSON; HENRISSAT, 1997). As medições das distâncias de ligação, bem como a elaboração das imagens representativas das interações foram realizadas com o *software* Pymol (<https://pymol.org/2/>).

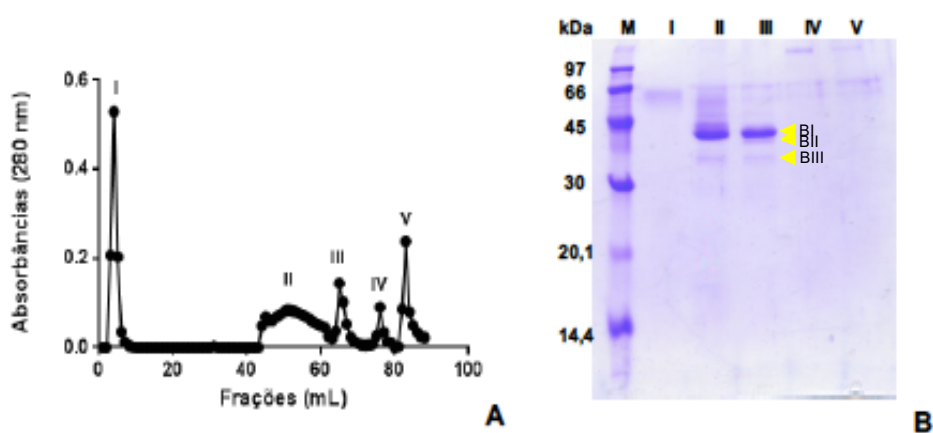
6 RESULTADOS

6.1 Purificação da proteína recombinante

Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenil sepharose CL4B foi realizada com a fração proteica obtida do meio de cultura de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736, precipitado a 95% de saturação com sulfato de amônio. A proteína recombinante foi visualizada por SDS-PAGE, após eluição dos picos cromatográficos em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo 0,6 M e 0,3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 5). Este método também foi avaliado substituindo-se o tampão acetato de sódio por tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,4 contendo as mesmas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a eluição da proteína manteve-se nas mesmas condições.

Após SDS-PAGE dos picos cromatográficos, rCV2736 apresentou-se sob três isoformas com massas moleculares aparentes aproximadas de 41, 38 e 36 kDa, denominadas de BI, BII e BIII, respectivamente de acordo com suas massas. Para os demais métodos cromatográficos testados, não foi possível a purificação da proteína recombinante.

Figura 5 – Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenyl sepharose de rCV2736



A: Perfil cromatográfico; B: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), evidenciando nos picos II e III a rCV2736. M: marcador *Low weight marker* (GE healthcare); I a III: picos obtidos na presença de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo 1,5, 0,6 e 0,3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente; IV: água; V: NaOH 0,1 M. As bandas referentes a proteína recombinante estão indicadas na figura.

Fonte: elaborada pela autora

6.2 Caracterização bioquímica parcial de rCV2736

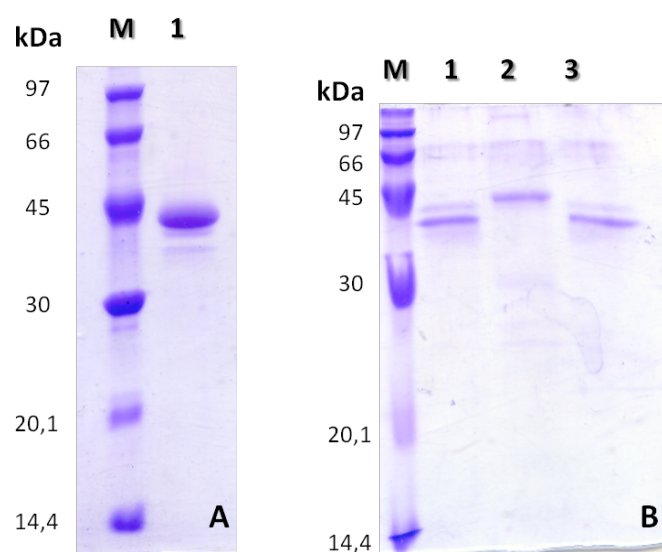
6.2.1 Sequenciamento N-terminal de rCV2736

A seqüência N-terminal da proteína recombinante, obtida pelo método de Edman, referente a banda do gel de poliacrilamida com massa molecular aparente de 41,2kDa (BI), apresentou 33 resíduos de aminoácidos: **EAEAEFVLAYYSYAGNYAALTRYAASFNAVAV**. Na porção N-terminal da proteína foram encontrados os resíduos iniciais adicionados pelo vetor de expressão pPICZ α A (resíduos de aminoácidos na sequencia EAEA), bem como os resíduos que codificam para o sítio de clonagem utilizando a enzima restrição *EcoRI* (resíduos de aminoácidos na sequencia EF). Devido à porção inicial apresentar os quatro aminoácidos referidos (EAEA), comprova-se que houve o correto processamento do fator α de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, que também é adicionado pelo vetor de expressão como estratégia para secreção de rCV2736 por *P. pastoris*, pela enzima Kex2 produzida pela levedura.

6.2.2 Deglicosilação com as enzimas N e O-glicosidase

Reações de deglicosilação com as enzimas N-glicosidase F e O-glicosidase foram realizadas a fim de saber se rCV2736 produzida em células de *P. pastoris* KM71H possui glicosilação. O processo de deglicosilação foi visualizado através de SDS-PAGE, utilizando-se 8 μ g das isoformas da proteína recombinante obtida após cada reação (Figura 6).

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da reação de deglicosilação das isoformas de rCV2736 utilizando as enzimas N-Glicosidase F e O-Glicosidase



As bandas foram reveladas com corante *Coomassie Brilliant Blue*. M. marcador *Low Molecular WeightMarker* (GE Healthcare); A: rCV2736 não tratada; B: rCV2736 digerida com a N-glicosidase F (1), O-glicosidase (2) e com as duas enzimas em combinação (3).

Fonte: elaborada pela autora

Bandas com massas moleculares aparentes diferenciadas, 35.682 Da (35,7 kDa) e 34.988 Da (35 kDa), aproximadamente, foram visualizadas devido à deglicosilação ocorrida nas reações que continham a N-glicosidase F (raia 1 e 3, figura 6B). Na reação feita somente com a O-glicosidase (raia 2, figura 6B), a banda encontrada possui aproximadamente 41.034 Da (41 kDa). Essas reações elucidam o fato da massa molecular aparente de rCV2736 apresentar 41,3 kDa ao invés de 36,8 kDa como previsto através de sequência de aminoácidos da proteína pela inclusão dos seis aminoácidos (N-terminal iniciando por EAEAEF) adicionados pelo vetor de expressão pPICZ α A e resíduos relativos ao epítipo *c-myc*, *linker* e cauda de histidina.

6.2.3 Espectrometria de massas

Na análise dos peptídeos encontrados para cada banda, houve similaridade com peptídeos de quitinase de *Chromobacterium violaceum* (Tabela 1), após comparação com banco de dados, para os 3 *spots* proteicos analisados. Resíduos de glicanos foram encontrados nas amostras referentes à banda de aproximadamente 42 kDa (BI) e 38,1 kDa (BII), não sendo encontrado em nenhum dos peptídeos obtidos para a banda com 36,2 kDa (BIII).

Tabela 1 - Identificação dos *spots* retirados do gel de eletroforese (SDS-PAGE) a partir da fração 0 /95, de possíveis isoformas de rCV2736 produzida em *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736, por espectrometria de massas (técnica de ionização por eletropulverização, *electrospray*)

Isoformas	Peptídeo encontrado	ID NCBI	Descrição
BI	DTQALIAR	gi 34498191	chitinase [<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472] (CV2736)
BII	DTQALIAR	gi 34498191	chitinase [<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472] (CV2736)
BIII	DTQALIAR	gi 34498191	chitinase [<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472] (CV2736)

ID: identificação no banco de dados NCBI

Fonte: elaborada pela autora

Não houve cobertura em 100% dos peptídeos gerados para toda a sequência da proteína recombinante, incluindo os resíduos acrescentados pelo vetor de expressão. Para BI, apenas 19 resíduos de aminoácidos não foram cobertos através da análise, tendo portanto sido obtido 94,46% de cobertura para esta sequência; Para BII, 83,58% e BIII, 87,31% de cobertura, contando-se a partir dos resíduos de aminoácidos adicionados pelo vetor (¹EA), considerando-se a sequência n-terminal de cada isoforma. Por isso foram realizadas análises considerando outras modificações possíveis, como oxidação dos triptofanos, acetilação e formilação. Dos resultados obtidos para as amostras BI, BII e BIII foram encontrados peptídeos que corresponderiam à porção C-terminal (contendo a cauda de histidina) e N-terminal, contendo a sequência EAEAEF adicionados pelo vetor (Tabelas 2, 3 e 4). Peptídeos com desaminações, desidratações, amidação, fosforilação foram encontrados, bem como O e N-glicosilações nas bandas BI e BII.

Tabela 2 – Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry*) da sequência de aminoácidos de rCV2736, referente a banda de 42 kDa (BI)

Peptídeo	Massa (Da)		Sequência ¹	E-value	Cobertura da sequência (%)
	Experimental	Calculada			
1	1879.9177	1879.9162	K. ¹⁰² RFSGINVDFEAVAQGDR ¹¹⁸ .N	0.0075	5.4
2	1431.7189	1430.7419	R. ¹¹⁹ NNFSHFIVLGR ¹³⁰ .A	0.0093	3.8
3	1130.6644	1130.6699	K. ¹³⁹ LIVSVPAFSAK ¹⁴⁹ .D	0.039	3.5
4	1562.6722	1562.6750	K. ¹⁵⁰ DENHPANYGYDLR ¹⁶² .A	0.00057	4.1
5	4602.0841	4602.0519	R. ¹⁶³ ALGAAADYLQIMSYDEAIPAWDPGPVAGSDWMEDDLDY AVER ²⁰⁴ .V	5.5e-10	13.3
6	1509.7219	1508.7663	K. ²¹⁰ ILNGIPAYGYDWK ²²² .R	0.062	4.1
7	1294.5824	1294.6128	K. ²²³ RPGDGGMLYWK ²³³ .D	0.39	3.5
8	886.4061	886.4872	K.DTQALIAR.Y	2	2.5

9	2001.8908	2001.8817	R. ²⁴⁸ YDAGTHSLTFNYGAADGSR ²⁶⁶ .H	1.4e-08	6.0
10	1113.4690	1112.5363	R. ²⁶⁷ HTVWTENAR ²⁷⁵ .S	2.4	2.9
11	2989.4428	2989.4531	K. ²⁸¹ ASLVNAYGLGGTSLYALGMEDDAFWAAVK ³⁰⁹ .Q	3.1e-07	9.2

¹O número antes e depois de cada sequência indica a posição dos respectivos resíduos (relativo a Glu¹) na sequência de aminoácidos correspondente no NCBI.

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 3 – Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry*) da sequência de aminoácidos de rCV2736, referente a banda de 38,1 kDa (BII)

Peptídeo	Massa (Da)		Sequência ¹	E-value	Cobertura da sequência (%)
	Experimental	Calculada			
1	3871.8601	3870.8595	K. ⁵⁹ IPAYGCVSNVDGNGNWSADIAHAVSTSAQSQAVANL VK. ⁹⁶ F	0.00067	12.1
2	1879.9255	1879.9177	K. ¹⁰² RFSGINVDFEAVAQGDR ¹¹⁸ .N	4	5.4
3	1723.8260	1723.8166	R. ¹⁰³ FSGINVDFEAVAQGDR ¹¹⁸ .N	7.7e-06	5.1
4	1430.7220	1430.7419	R. ¹¹⁹ NNFSHFQVLGR ¹³⁰ .A	0.051	3.8
5	1130.6696	1130.6699	K. ¹³⁹ LIVSVPAFSAK ¹⁴⁹ .D	0.0084	3.5
6	2675.3377	2675.3343	K. ¹³⁹ LIVSVPAFSAKDENHPANYGYDLR ¹⁶² .A	21	7.6
7	1562.6557	1562.6750	K. ¹⁵⁰ DENHPANYGYDLR ¹⁶² .A	0.0092	4.1
8	4602.0592	4602.0519	R. ¹⁶³ ALGAAADYLQIMSYDEAIPAWDPGPVAGSDWMED DLDYAVER ²⁰⁴ .V	3.9	13.3

9	1509.7254	1508.7663	K. ²¹⁰ ILNGIPAYGYDWK ²²² .R	4.2	4.1
10	1278.6210	1278.6179	K. ²²³ RPGDGGMLYWK ²³³ .D	76	3.5
11	2001.8888	2001.8817	R. ²⁴⁸ YDAGTHSLTFNYGAADGSR ²⁶⁶ .H	2.4e-07	6.0
12	1112.5198	1112.5363	R. ²⁶⁷ HTVWTENAR ²⁷⁵ .S	17	2.9
13	2989.4653	2989.4531	K. ²⁸¹ ASLVNAYGLGGTSLYALGMEDDAFWAAVK ³⁰⁹ .Q	0.0083	9.2

¹O número antes e depois de cada sequência indica a posição dos respectivos resíduos (relativo a Glu¹) na sequência de aminoácidos correspondente no NCBI.

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 4 – Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry*) da sequência de aminoácidos de rCV2736, referente a banda de 36,2 kDa (BIII)

Peptídeo	Massa (Da)		Sequência ¹	E-value	Cobertura da sequência (%)
	Experimental	Calculada			
1	3871.8592	3870.8595	K. ⁵⁹ IPAYGCVSNVDGNGNWSADIAHAVSTSAQSQAVANL VK. ⁹⁶ F	0.002	12.1
2	1723.8052	1723.8166	R. ¹⁰³ FSGINVDFEAVAQGDR ¹¹⁸ .N	1.3e-05	5.1
3	1431.7370	1430.7419	R. ¹¹⁹ NNFSHFQVLGR ¹³⁰ .A	0.0091	3.8
4	1130.6786	1130.6699	K. ¹³⁹ LIVSVPAFSAK ¹⁴⁹ .D	0.19	3.5
5	2675.3386	2675.3343	K. ¹³⁹ LIVSVPAFSAKDENHPANYGYDLR ¹⁶² .A	2.9	7.6
6	1562.6494	1562.6750	K. ¹⁵⁰ DENHPANYGYDLR ¹⁶² .A	0.0021	4.1
7	4586.0875	4586.0570	R. ¹⁶³ ALGAAADYLQIMSYDEAIPAWDPGPVAGSDWMED DLDYAVER ²⁰⁴ .V	7.2	13.3

8	1509.6668	1508.7663	K. ²¹⁰ ILNGIPAYGYDWK ²²² .R	3.2	4.1
9	1294.6244	1294.6128	K. ²²³ RPGDGGMLYWK ²³³ .D	5.6	3.5
10	886.4834	886.4872	K. ²³⁴ DTQALIAR ²⁴¹ .Y	64	2.5
11	2001.8944	2001.8817	R. ²⁴⁸ YDAGTHSLTFNYGAADGSR ²⁶⁶ .H	1.2e-05	6.0
12	1112.4718	1112.5363	R. ²⁶⁷ HTVWTENAR ²⁷⁵ .S	17	2.9
13	2989.4566	2989.4531	K. ²⁸¹ ASLVNAYGLGGTSLYALGMEDDAFWAAVK ³⁰⁹ .Q	0.00011	9.2

¹O número antes e depois de cada sequencia indica a posição dos respectivos resíduos (relativo a Glu¹) na sequencia de aminoácidos correspondente no NCBI.

Fonte: elaborada pela aut

6.2.4 Atividade quitinásica da rCV2736

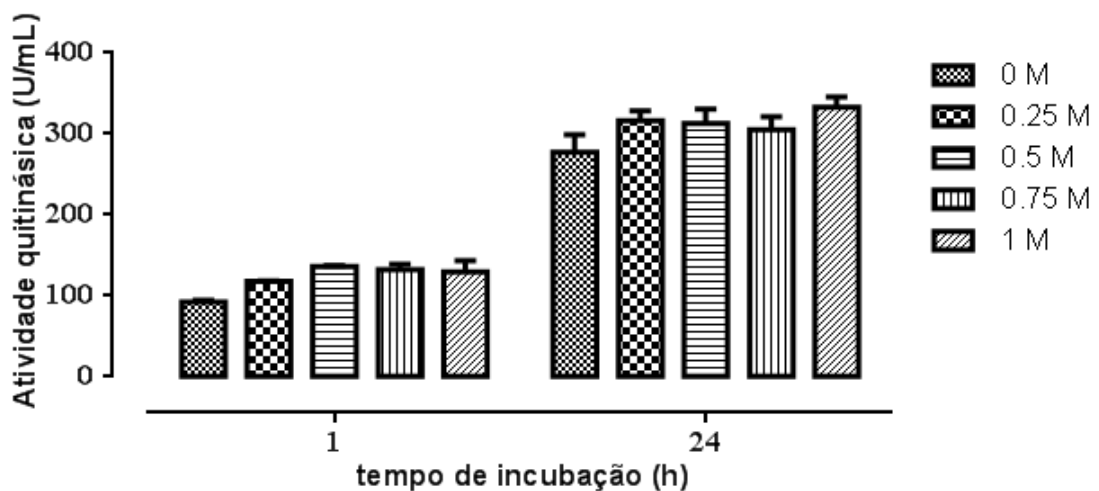
6.2.4.1 Efeito do tempo de incubação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal

A atividade quitinásica foi aumentada com um maior tempo de incubação com quitina coloidal (de 90,4 U para 137,5 U), o que corresponde a um aumento de 47,1 U em relação a atividade com 1 h de incubação. A necessidade de um maior tempo de incubação para a detecção de atividade indica a baixa atividade quitinásica apresentada por rCV2736.

6.2.4.2 Efeito da concentração de NaCl e do tempo de reação na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal

Com relação à presença de NaCl na amostra, houve um ligeiro aumento na atividade apresentada entre o controle (amostra sem NaCl) e com 0,25 mM de NaCl, nos mesmos tempos de incubação, porém não houve diferença entre as concentrações testadas (figura 7).

Figura 7- Efeito de diferentes concentrações de NaCl, com 1 h e 24 h de incubação, sobre a atividade quitinásica da rCV2736 (fração F0/95 do meio de cultura livre de células de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736), tendo quitina coloidal como substrato

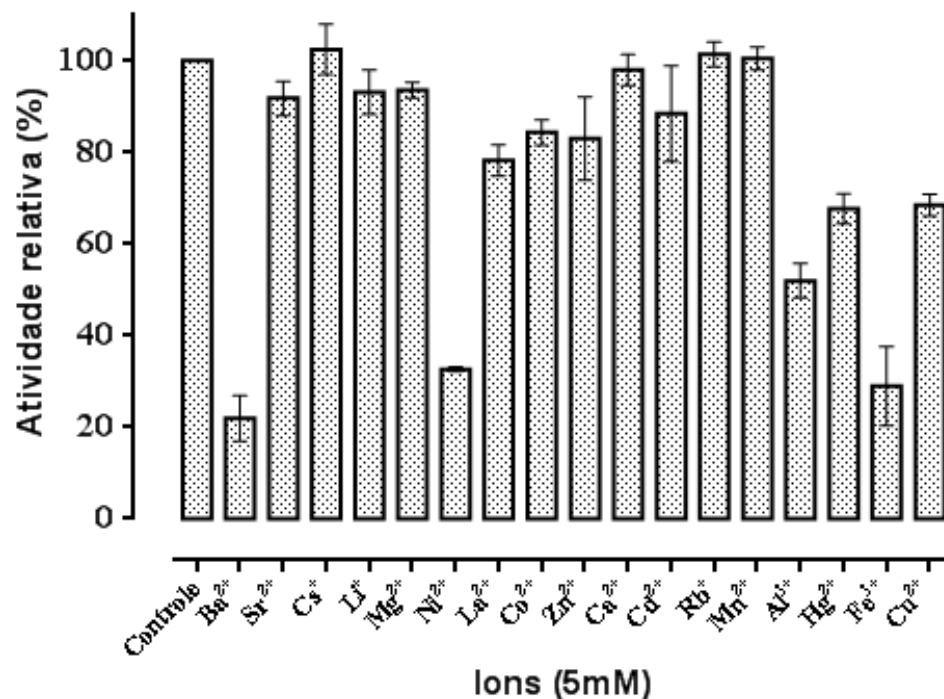


Fonte: elaborada pela autora

6.2.4.3 Efeito da presença de metais na atividade quitinásica de rCV2736 sobre quitina coloidal

No ensaio realizado na presença de íons metálicos, em relação ao controle (amostra sem tratamento com íons metálicos), a interação com Ba^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} causaram uma diminuição da atividade relativa em mais de 50%. Nenhum dos íons metálicos testados potencializou a atividade quitinásica (Figura 8).

Figura 8 - Efeito de diferentes íons metálicos, com 1 h de incubação, sobre a atividade quitinásica da rCV2736 (fração F0/95 do meio de cultura livre de células de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736), tendo quitina coloidal como substrato



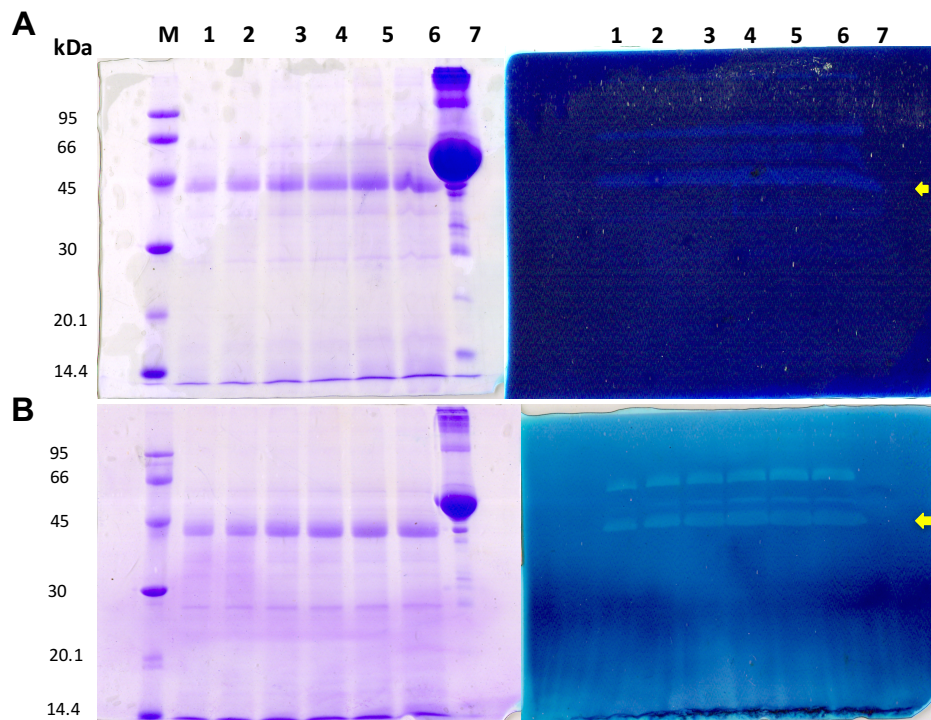
Tempo de reação: 1h; Controle: reação enzimática contendo rCV2736 na ausência de metais.

Fonte: elaborada pela autora

6.2.5 Atividade peptidoglicano hidrolase de rCV2736

Para avaliação de uma possível atividade peptidoglicano hidrolase, foi realizado um ensaio de zimografia *in gel*, utilizando como substratos células bacterianas Gram-positivo e Gram-negativo. Nos géis foram visualizadas bandas referentes a lise celular, com massa molecular aparente referente a rCV2736 (41,2 kDa), quando comparadas com géis sem o substrato bacteriano, quando se aplicou 5, 7, 5, 10, 12,5, 15 e 20 μg da fração proteica (Figuras 9 e 10).

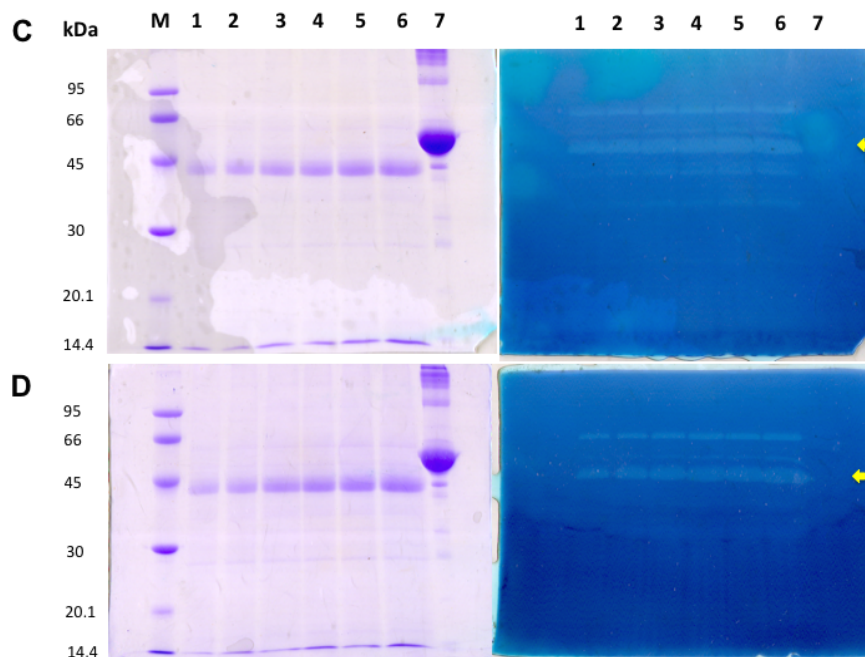
Figura 9 - SDS-PAGE e zimograma para detecção da atividade peptidoglicano hidrolase da rCV2736 fração F0/95 do meio de cultura livre de células de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736)



As bandas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue (SDS-PAGE) e azul de metileno 0,1% (zimograma). M: marcador *low weight marker* (GE Healthcare); 1 a 6: F0/95 (5, 7,5, 10, 12,5 e 15 μg de proteína recombinante, respectivamente); 7: Controle negativo (Albumina sérica bovina 30 μg – Sigma-Aldrich); A: SDS-PAGE e zimograma com células de *S. aureus* ATCC6538P; B: SDS-PAGE e zimograma com células de *S. choleraesuis* ATCC 10536. Setas amarelas indicam a banda referente a isoforma BI de rCV2736.

Fonte: elaborada pela autora

Figura 10 - SDS-PAGE e zimograma para detecção da atividade peptidoglicano hidrolase da rCV2736 (fração F0/95 do meio de cultura livre de células de *P. pastoris* KM71H::pPICZ α A::CV2736)



As bandas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue (SDS-PAGE) e azul de metileno 0,1% (zimograma). M: marcador *low weight marker* (GE Healthcare); 1 a 6: F0/95 (5, 7,5, 10, 12,5 e 15 µg de proteína recombinante, respectivamente); 7: Controle negativo (Albumina sérica bovina 30 µg – Sigma-Aldrich); C: zimograma com células de *E. coli* ATCC 10536; D: *P. aeruginosa* ATCC 9027. Setas amarelas indicam a banda referente a isoforma BI de rCV2736.

Fonte: elaborada pela autora

6.3 Atividade biológica de rCV2736

6.3.1 Atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre células microbianas em crescimento planctônico

6.3.1.1 Concentrações inibitória mínima e bactericida mínima

A fração cromatográfica contendo as isoformas purificadas da proteína recombinante rCV2736 foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas, sendo bactericida para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031, quando na concentração de 365 µg/mL (Tabela 5; Figura 11). Não foi possível determinar a CIM para nenhuma das leveduras testadas.

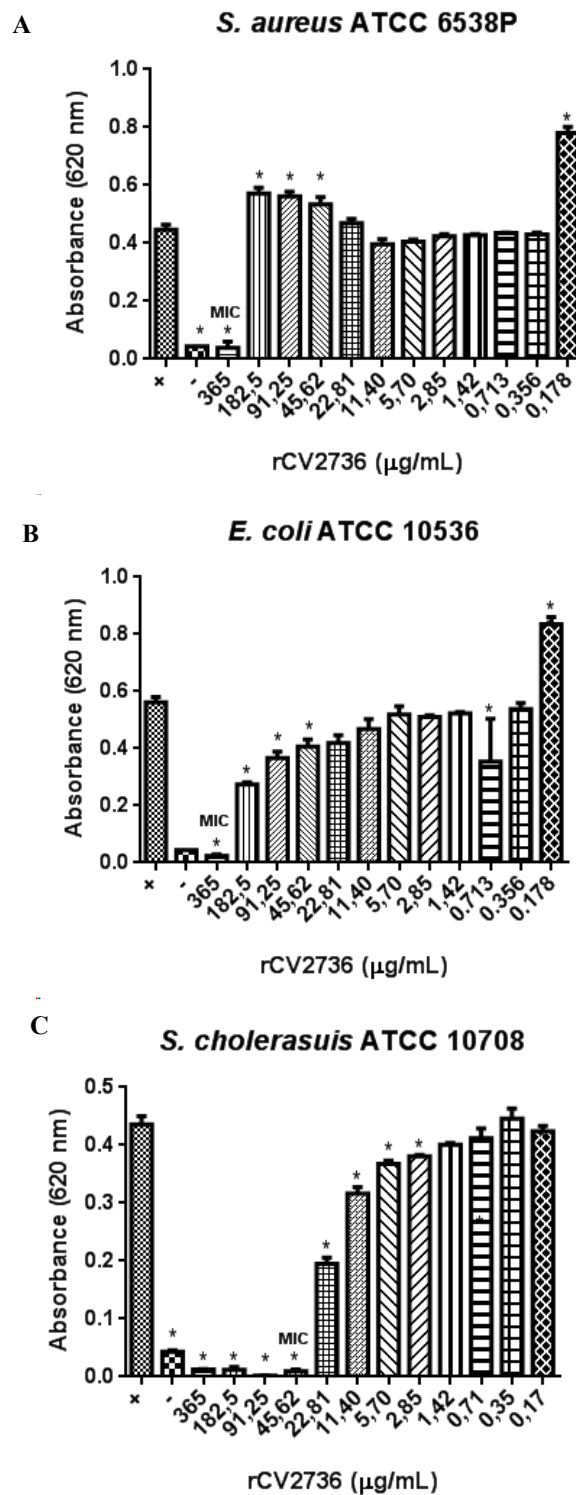
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de rCV2736

Cepas	rCV2736	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	182,5	365
<i>E. coli</i> ATCC 10536	365	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	365	ND
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	45	ND
<i>K. pneumonia</i> ATCC 10031	182,5	365

Três experimentos independentes realizados em triplicata. ND: não determinado.

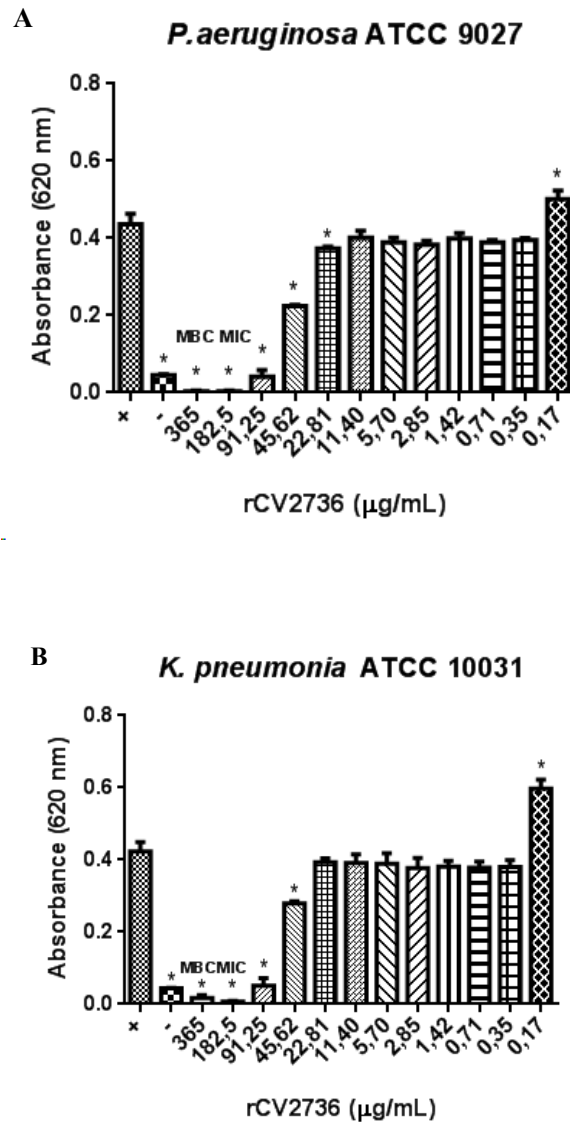
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 11 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de rCV2736 para *S. aureus*, *E. coli* e *S. cholerasuis*.



As leituras de $DO_{620\text{ nm}}$ foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (-): controle negativo de crescimento; (+): controle positivo do crescimento: meio de cultura + inóculo. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de rCV2736 para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

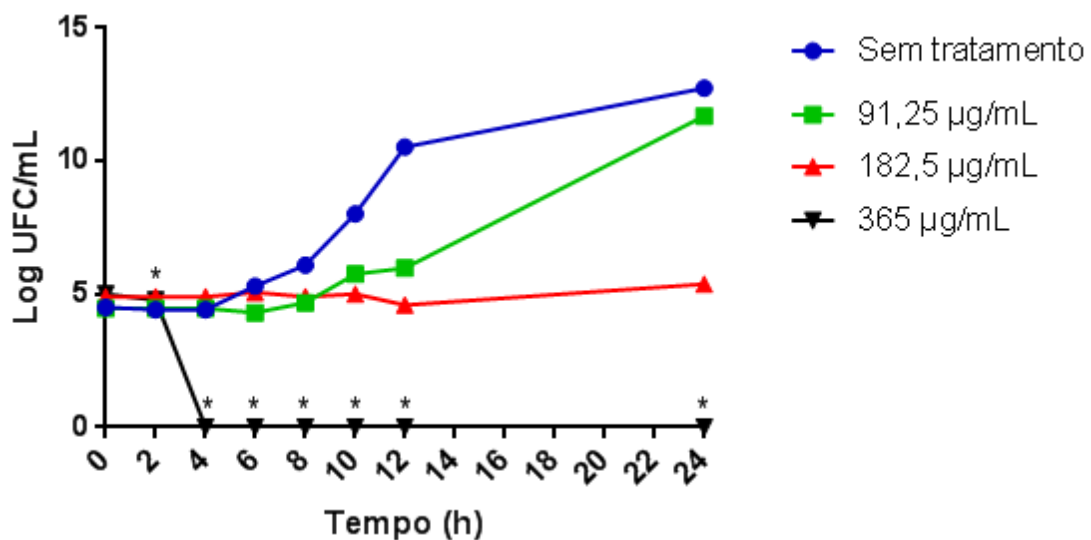


As leituras de $DO_{620\text{ nm}}$ foram realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (-): controle negativo de crescimento; (+): controle positivo do crescimento: meio de cultura + inóculo. Fonte: elaborada pela autora.

6.3.1.2 Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade das cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumonia* ATCC 10031

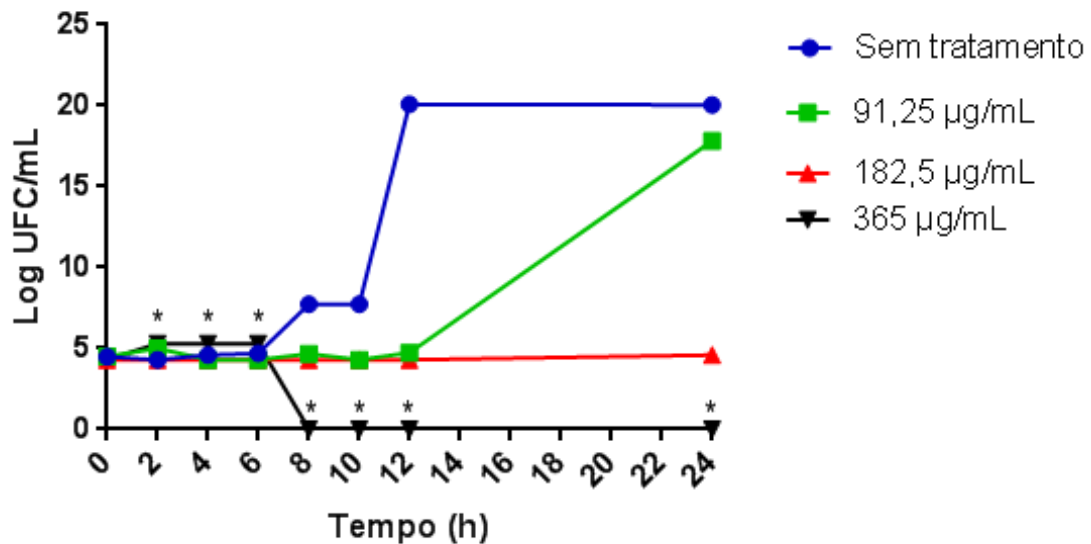
Devido a um melhor desempenho da rCV2736 sobre as bactérias *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumonia* ATCC 10031, os demais experimentos foram realizados somente com estas. A exposição a CBM (365 µg/mL) de rCV2736 inviabilizou o crescimento das cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumonia* ATCC 10031 após 4h e 8 h, respectivamente. Quando expostas a CIM (182,5 µg/mL) da rCV2736, as duas cepas tiveram seu crescimento inibido por todo o período do ensaio, 24h (Figura 13 e Figura 14).

Figura 13 – Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade de *P. aeruginosa* ATCC 9027



Os valores representam a média ± EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$. UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro. Fonte: elaborada pela autora

Figura 14 – Efeito do tempo de exposição a rCV2736 na viabilidade de *K. pneumoniae* ATCC 10031



Os valores representam a média \pm EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$. UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro. Fonte: elaborada pela autora.

6.3.1.3 Efeito da alteração de pH na atividade antimicrobiana de rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031

O aumento do pH do meio de cultura determinou uma redução do potencial antibacteriano da rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031. Em pH neutro ou superior toda a atividade da proteína recombinante foi perdida, nas concentrações testadas (Tabela 6).

Tabela 6 –Efeito do pH na atividade antibacteriana de rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumonia* ATCC 10031

pH	CIM de rCV2736 (µg/mL)	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>K. pneumonia</i> ATCC 10031
5,5	182,5	182,5
6,0	365	365
6,5	365	365
7,0	ND	ND
7,5	ND	ND

ND: não determinado para as concentrações testadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.1.4 Efeito modulador da proteína recombinante rCV2736 na atividade de antimicrobianos (ATB) de uso clínico

O efeito sinérgico foi constatado para as associações de 1/4 x CIM de rCV2736 com 1/16 x CIM de Ceftazidima ou de Tetraciclina para *P. aeruginosa* (Tabela 7). Já para *K. pneumoniae*, observou-se efeito sinérgico para as associações de ¼ x CIM de rCV2736 com 1/6 x CIM de Amicacina e 1/16 x CIM de rCV2736 com ¼ x CIM de Tetraciclina (Tabela 8). Para as outras associações testadas, capazes de inibir o crescimento visual das cepas, o efeito observado foi de adição ou indiferença.

Tabela 7 – Efeito modulador da rCV2736 na atividade antimicrobiana de antimicrobianos de uso clínico sobre o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 9027

Antibióticos	CIF rCV2736	CIF ATB	ICIF	Efeito
Piperacilina +Tazobactam	0,5	0,0625	0,5625	Aditivo
Amicacina	0,0625	0,5	0,5625	Aditivo
Ceftazidima	0,125	0,0625	0,3125	Sinérgico
Tetraciclina	0,125	0,0625	0,3125	Sinérgico

Os dados da tabela apresentam as menores concentrações em associações com inibição do crescimento microbiano. $CIF_{rCV2736} = [rCV2736]/CIM_{rCV2736}$; $CIF_{ATB} = [ATB]/CIM_{ATB}$; $ICIF = CIF_{rCV2736} + CIF_{ATB}$, onde $[rCV2736]$ e $[ATB]$ são as menores concentrações de rCV2736 e de ATB, respectivamente, nas associações capazes de inibir o crescimento bacteriano;

ATB: antimicrobiano;

$ICIF \leq 0,5$: sinergismo; $ICIF > 0,5$ e $< 1,0$: aditivo ou indiferente; $ICIF \geq 1,0$: antagonismo (EUCAST, 2003).

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 8 – Efeito modulador da rCV2736 na atividade antimicrobiana de antimicrobianos de uso clínico sobre o crescimento de *K. pneumoniae* ATCC 10031

Antibióticos	CIF rCV2736	CIF ATB	ICIF	Efeito
Piperacilina +Tazobactam	0,125	0,25	0,375	Aditivo/indiferente
Amicacina	0,25	0,0625	0,3125	Sinérgico
Ceftazidima	0,5	0,0625	0,5625	Aditivo/indiferente
Tetraciclina	0,0625	0,25	0,3125	Sinérgico

Os dados da tabela apresentam as menores concentrações em associações com inibição do crescimento microbiano. $CIF_{rCV2736} = [rCV2736]/CIM_{rCV2736}$; $CIF_{ATB} = [ATB]/CIM_{ATB}$; $ICIF = CIF_{rCV2736} + CIF_{ATB}$, onde $[rCV2736]$ e $[ATB]$ são as menores concentrações de rCV2736 e de ATB, respectivamente, nas associações capazes de inibir o crescimento bacteriano;

ATB: antimicrobiano;

$ICIF \leq 0,5$: sinergismo; $ICIF > 0,5$ e $< 1,0$: aditivo ou indiferente; $ICIF \geq 1,0$: antagonismo (EUCAST, 2003).

Fonte: elaborada pela autora.

6.3.2 Atividade antimicrobiana da proteína recombinante rCV2736 sobre biofilmes de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumonia* ATCC 10031

6.3.2.1 Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB)

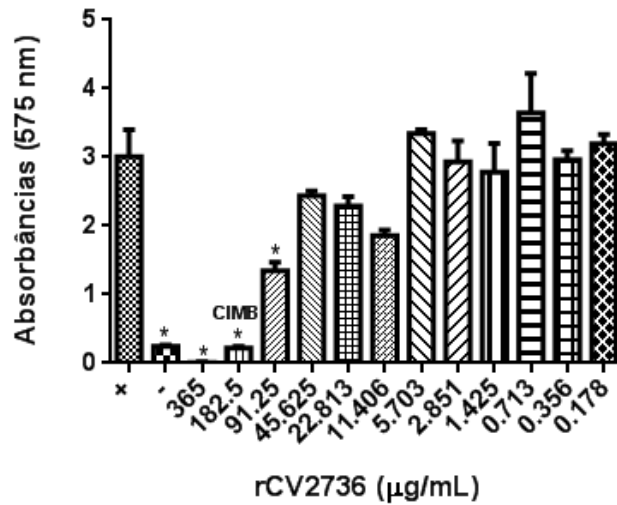
De acordo com os métodos de classificação (MALDONADO et al., 2007), as cepas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram consideradas como altas produtoras de biofilme.

A rCV2736 foi capaz de inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* nas concentrações acima de 182,5 µg/mL. Na concentração de 91,25 µg/mL, a proteína foi capaz de reduzir em 55,17% e 13,12% a capacidade de formação de biofilme de *P. aeruginosa* e de *K. pneumoniae*, respectivamente por ação sobre as células planctônicas (Figuras 15 e 16).

6.3.2.2 Concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB)

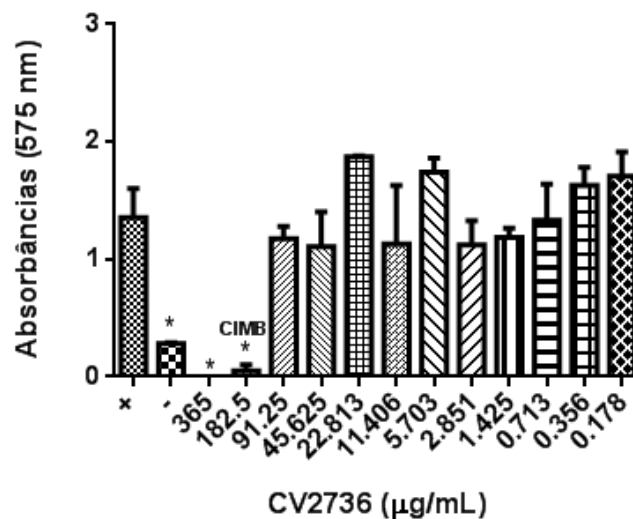
Uma redução no número de UFC/ml foi observada para as concentrações de rCV2736 usadas sobre o biofilme formado, onde com um aumento da concentração da proteína para 365 e 730 µg/mL (2x e 4x a CIM, respectivamente), o número de células viáveis desagregadas do biofilme remanescente após tratamento diminuiu em 17,84% (365 µg/mL) e 22,94% (730 µg/mL) para *P. aeruginosa* e 22,68% (365 µg/mL) e 27,6% (730 µg/mL) para *K. pneumoniae*, quando comparada ao biofilme não-tratado (Tabela 9).

Figura 15- Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB) de rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027



As leituras de $DO_{575\text{ nm}}$ realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias \pm EPM. (-): controle negativo de crescimento (meio de cultura estéril); (+): controle positivo do crescimento: meio de cultura + inóculo. Fonte: elaborada pela autora

Figura 16 - Concentração Inibitória Mínima no Biofilme (CIMB) de rCV2736 sobre *K. pneumoniae* ATCC 10031



As leituras de $DO_{575\text{ nm}}$ realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek). Os valores representam as médias \pm EPM. (-): controle negativo de crescimento (meio de cultura estéril); (+): controle positivo do crescimento: meio de cultura + inóculo. Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 9 – Concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) de rCV2736 sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031

rCV2736 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	
	UFC/mL	Redução de crescimento (%)	UFC/mL	Redução de crescimento (%)
0 ^(*)	12,16 \pm 0,006	-	12,21 \pm 0,006	-
365	9,99 \pm 0,04	17,84	9,44 \pm 0,02	22,68
730	9,37 \pm 0,03	22,94	8,84 \pm 0,21	27,6

(*) biofilme não tratado com rCV2736;

Valores apresentados como UFC/mL \pm EPM; Experimento realizado em triplicata com uma repetição.

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

Fonte: Elaborada pela autora

6.3.3 Atividade tripanocida in vitro da proteína recombinante rCV2736

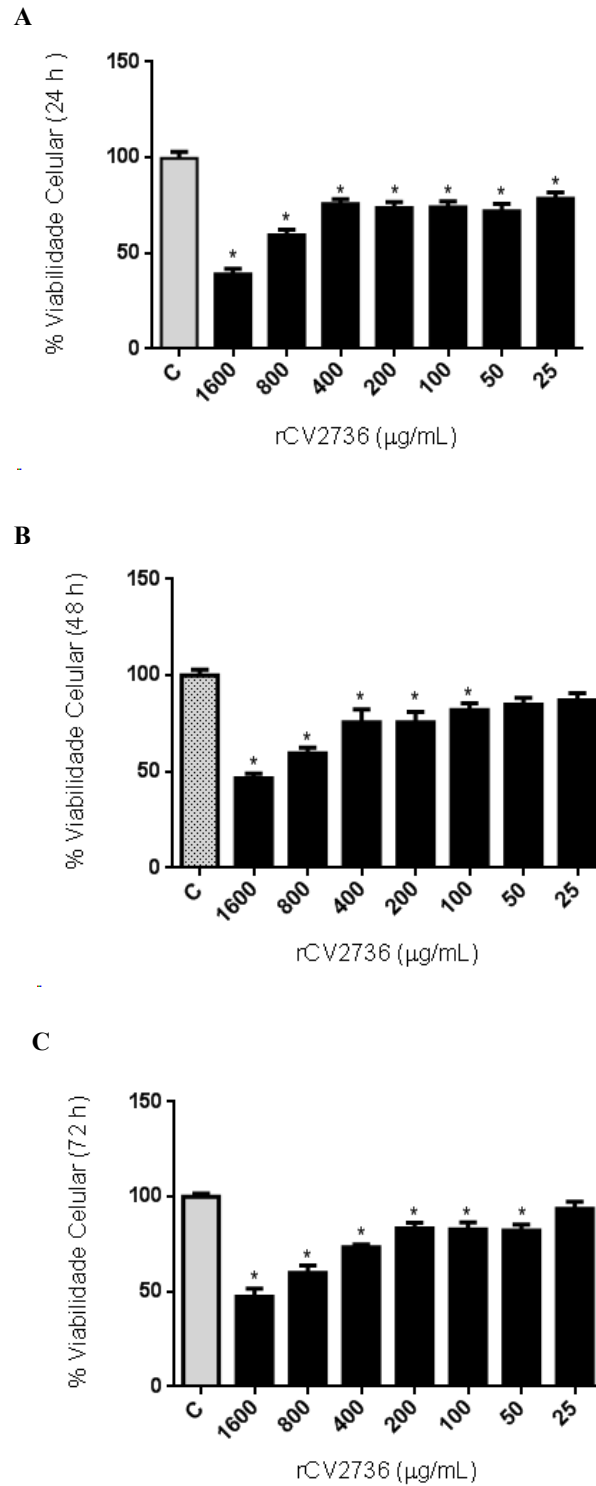
6.3.3.1 Sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*

A atividade antiparasitária da proteína recombinante foi avaliada em células na forma epimastigota e tripomastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, através da contagem de células viáveis, utilizando concentrações de rCV2736 na faixa de 12,5 a 1600 µg/mL para os ensaios com epimastigotas, e 6,25 a 400 µg/mL para o experimento com tripomastigota (Figura 17).

Para os epimastigotas, após 24 h de tratamento, foram constatadas reduções no número de células viáveis em todas as concentrações testadas, quando comparadas com o controle (formas epimastigotas sem tratamento) (Figura 17A). A IC₅₀ determinada através dos experimentos para rCV2736 foi de 1089 µg/mL, sendo a concentração de 1600 µg/mL (maior concentração de proteína recombinante testada) capaz de reduzir em aproximadamente 60% o número de organismos viáveis em todos os tempos testados.

Para os tripomastigota, a IC₅₀ encontrada foi de 118,3 µg/mL, após 24 h de tratamento com rCV2736. Após este mesmo tempo de tratamento com a proteína recombinante, houve reduções no número de células viáveis em todas as concentrações testadas, quando comparadas com o controle não tratado (Figura 18). A concentração de 400 µg/mL (maior concentração de proteína testada) foi capaz de reduzir em aproximadamente 70% o número de tripomastigotas viáveis após o tempo de tratamento. Já a concentração de 200 µg/mL foi capaz de reduzir em 52% o número de células viáveis.

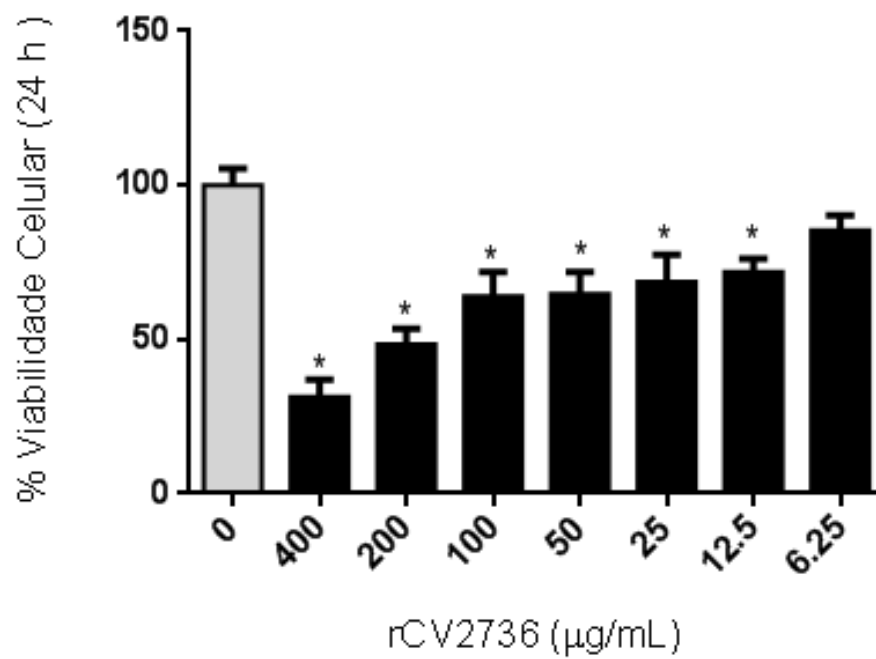
Figura 17 – Viabilidade celular de formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratadas com rCV2736



Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos com três repetições cada. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$.

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 18 - Viabilidade celular de formas tripomastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratadas com rCV2736



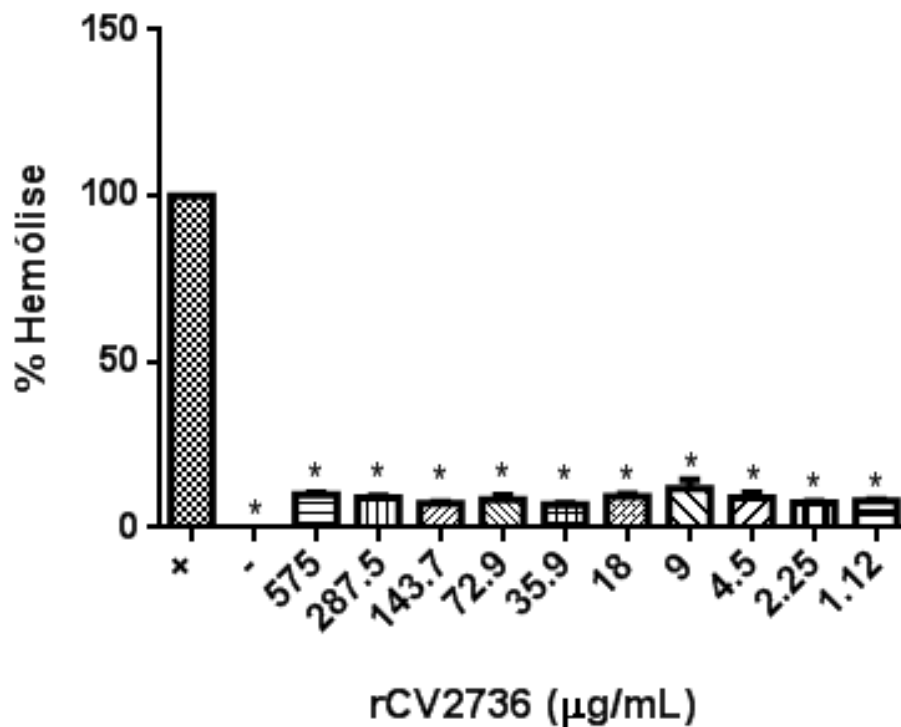
Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos com três repetições cada. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$.

Fonte: elaborada pela autora.

6.3.4 Hemotoxicidade de rCV2736

A proteína recombinante rCV2637 não apresentou atividade hemolítica sobre eritrócitos de carneiro nas concentrações de 1,12 a 575 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18). O resultado apresentado foi significativo quando comparadas com o controle positivo para atividade hemolítica (células tratadas com solução de Triton X-100 1%). Tanto a CIM (variando de 45 a 365 $\mu\text{g/ml}$) quanto a CLM (365 $\mu\text{g/mL}$) para os microrganismos testados são menores do que a maior concentração utilizada neste ensaio.

Figura 19 – Atividade hemolítica da rCV2637 sobre eritrócitos de carneiro



(+): controle positivo para hemólise (células tratadas com Triton X-100 1%); (-): controle negativo para hemólise (células tratadas com tampão PBS).

Fonte: elaborada pela autora.

6.4 Docking molecular

6.4.1 Estrutura tridimensional de rCV2736 por modelagem por homologia

A proteína rCV2736 foi modelada, utilizando como molde uma glicosidase relacionada a esporulação (ydhD) de *Bacillus subtilis* (PDB: 3CZ8), utilizando-se o servidor Phyre2.0, onde apresentou estrutura tridimensional com dobramento do tipo barril TIM (triose fosfato isomerase), característico das proteínas pertencentes a família 18 das glicosil hidrolase (GH18) (Figura 19). Posteriormente, o modelo foi pré-avaliado com as ferramentas Molprobitry e WhatIF, onde os resíduos de aminoácidos Ala⁹¹(Ø124,4, -40,1), Arg¹⁰⁷(87,0, 29,1) e Arg²²⁸(-72,3, 93,5) estavam em regiões não-permitidas (*outliers*), 2 rotâmeros pobres (0,91%) também foram encontrados, o valor de desvio C β foi de 6,34%, ângulos e ligações ruins fora do limite permitido pelas avaliações dos programas também foram apresentados (Tabela 10).

Alterações para a otimização da estrutura foram realizadas, utilizando-se a ferramenta *Coot* e a minimização da energia foi realizada com o servidor *Gaia*, na plataforma *Chiron*, bem como com auxílio da plataforma *Galaxy Web*, onde após o processo de refinamento, foi possível ter 99,09% de todos os rotâmeros favoráveis e nenhum resíduo de aminoácido em regiões não-permitidas, com 98,65% destes em regiões favoráveis.

Tabela 10 – Análise estatística dos parâmetros estereoquímicos da estrutura tridimensional do modelo gerado para rCV2736

	Antes da otimização	Depois da otimização
(a) Análise do gráfico de Ramachandran¹		
Clashscore, all atoms (N=1784, all resolutions)	63.08 (1 st percentile *)	0.00 (100 th percentile *)
% Poor rotamers (Goal: <0.3%)	0.91	0.00
% Favored rotamers (Goal: >98%)	98.17	99.09
% residues in outliers regions (Goal: <0.05%)	1.01	0.00
% residues in favored regions (Goal: >98%)	93.58	98.65
% C β deviations >0.25Å (Goal: 0%)	6.34	2.61
% Bad bonds (Goal: 0%)	0.48	0.00
% Bad angles (Goal: <0.1%)	4.31	0.76
% Peptide omegas – Cis prolines (Expected: ≤ 1 per chain, or $\leq 5\%$)	0.00	0.00
MolProbity score [^] (N=27675, 0Å - 99Å)	2.68 (37 th percentile *)	0.50 (100 th percentile *)
(b) RMS z-scores²		
Bond lengths	0.626 (tight)	0.921
Bond angles	1.451	1.205
Omega angle restraints	1.014	0.284 (tight)
Side chain planarity	0.172 (tight)	0.596 (tight)
Improper dihedral distribution	1.697 (loose)	1.089
(c) z-scores da estrutura²		
1st generation packing quality	-0.978	-0.294
2nd generation packing quality	-1.845	-1.016
Ramachandran plot appearance	-0.763	0.246
chi-1/chi-2 rotamer normality	5.117	5.395
Backbone conformation	0.733	1.057
Inside/Outside distribution	1.006	1.005

¹Os parâmetros estatísticos para o gráfico de Ramachandram foram calculados com auxílio da plataforma MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>);²Valores de RMS e z-score da estrutura foram calculados utilizando WHAT IF (<http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/>);

A estrutura utilizada como molde para modelagem por homologia (PDB ID:3CZ8) foi incluída na comparação.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.4.2 Simulação de docking molecular

A partir deste modelo refinado, o processo de *docking* molecular foi realizado, utilizando-se dois ligantes diferentes: um tetrassacarídeo de N-acetil-D-Glucosamina [(GlicNac)₄] (Figura 20 A) e um tetrassacarídeo contendo unidades de N-acetil-D-Glucosamina alternadas com unidades de ácido N-acetilmurâmico[(GlcNac-MurNac)₂] (Figura 20 B). 20 poses foram geradas, com energia de afinidade variando de -7,0 a -6,5 para docking realizado com (GlcNac-MurNac)₂ e -7,1 a -6,2 para (GlicNac)₄ (Tabelas 11 e 12). Analisando os resultados obtidos, as moléculas dos dois ligantes foram capazes interagir de forma favorável na fenda catalítica predita, com base no reconhecimento do domínio das GH 18, nos subsítios +2 a -2 para ambos os ligantes (DAVIES; WILSON; HENRISSAT, 1997), onde foi possível visualizar interação entre o resíduo responsável pela catálise (Glu¹¹⁰) e o átomo de oxigênio da ligação glicosídica formada entre os resíduos de carboidrato alocados nos subsítios +1 e -1 da enzima (Figura 21).

Os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os ligantes podem ser visualizados na figura 19. Pontes de hidrogênio (Tabelas 13 e 14) e interações hidrofóbicas foram possíveis de se determinar através da avaliação do posicionamento dos ligantes na fenda catalítica da proteína. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos foram capazes de interagir com os ligantes, tais como Tyr⁵, Phe²⁹, Ala¹⁴⁴, Tyr¹⁷⁵, Ile¹⁷⁹, Tyr²¹⁶, Tyr²¹⁸ e Met²²⁸, bem como os resíduos acídicos, como Asp¹⁰⁸, Glu¹¹⁰ e Asp¹⁷⁶. Outros aminoácidos como Gly⁷¹ e Asn⁷² foram representados como possíveis de interagir com o ligante.

Figura 20 – Ligantes utilizados na simulação por Docking molecular com rCV2736

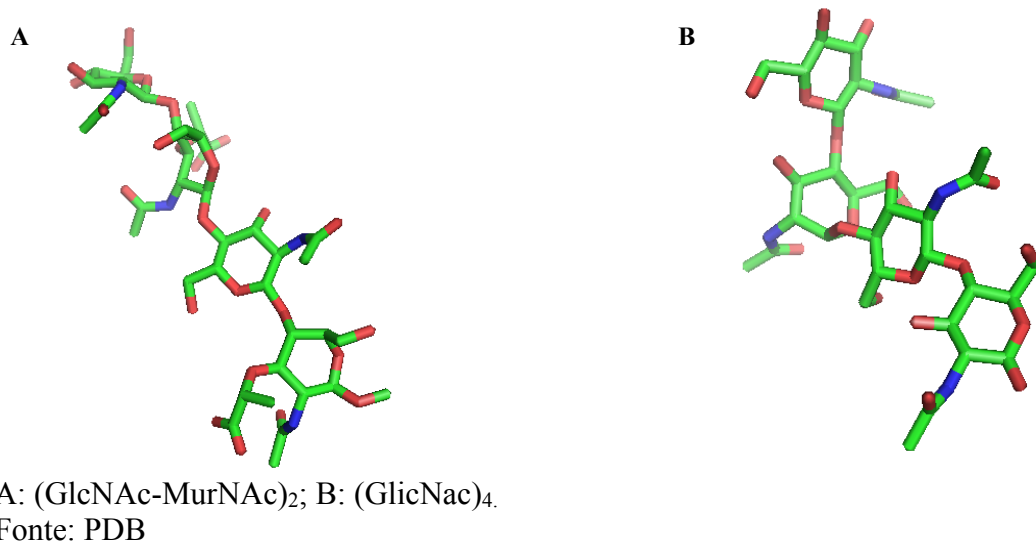
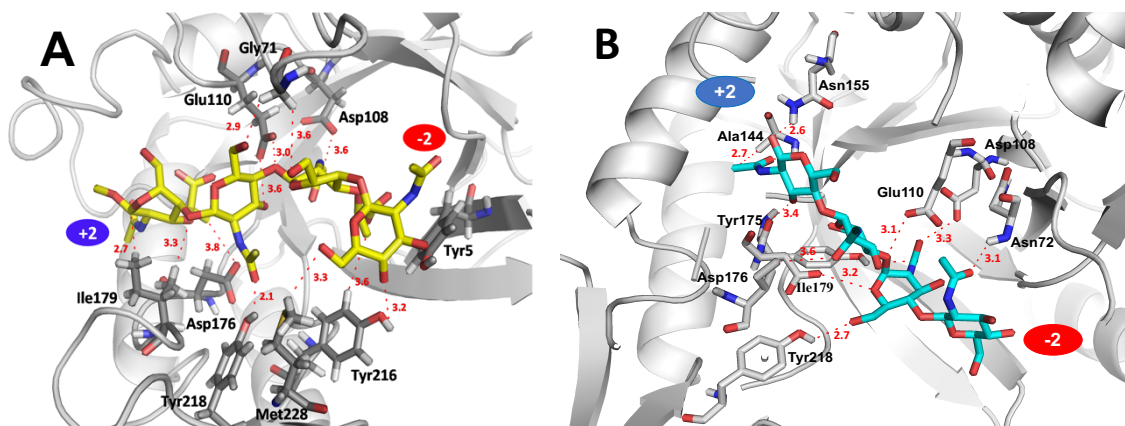


Figura 21 – Modelos tridimensionais gerados para rCV2736 com os ligantes (GlcNAc-MurNAc)₂ e (GlcNAc)₄, evidenciando os aminoácidos envolvidos na interação



Imagens obtidas através da análise das melhores poses da ligação enzima-substratos, nas posições +2 a -2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 – Valores de energia dos modelos para *docking molecular* utilizando como ligante o tetrassacarídeo [(GlcNAc-MurNAc)₂]

Pose	Afinidade (kcal/mol)	Melhor modelo (rmsdl.b.)	Melhor modelo (rmsdu.b.)
1	-7.0	0.000	0.000
2	-6.9	3.378	5.925
3	-6.9	4.201	8.258
4	-6.8	3.725	7.517
5	-6.8	4.104	8.204
6	-6.8	4.261	9.494
7	-6.7	8.638	14.720
8	-6.7	3.673	9.643
9	-6.7	5.463	9.028
10	-6.7	3.735	7.017
11	-6.6	3.105	6.687
12	-6.6	4.039	7.563
13	-6.6	2.506	4.157
14	-6.6	5.171	10.324
15	-6.5	4.277	8.239
16	-6.5	7.731	11.217
17	-6.5	3.888	7.905
18	-6.5	2.345	9.385
19	-6.5	3.960	7.387
20	-6.5	4.282	8.374

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 12 – Valores de energia dos modelos para *docking molecular* utilizando como ligante o tetrassacarídeo[(GlicNac)₄]

Pose	Afinidade (kcal/mol)	Melhor modelo (rmsdl.b.)	Melhor modelo (rmsdu.b.)
1	-7.1	0.000	0.000
2	-7.1	3.373	9.540
3	-7.0	3.162	8.537
4	-6.9	3.162	8.869
5	-6.7	3.291	8.191
6	-6.7	2.519	9.516
7	-6.6	3.231	4.919
8	-6.6	3.300	8.294
9	-6.6	2.903	9.409
10	-6.5	6.785	10.880
11	-6.5	3.328	6.809
12	-6.5	2.601	4.658
13	-6.4	1.713	2.693
14	-6.3	3.229	9.233
15	-6.3	2.183	4.789
16	-6.3	2.857	7.267
17	-6.3	2.252	4.826
18	-6.3	1.466	2.660
19	-6.2	4.479	8.871
20	-6.2	3.183	7.648

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 13 - Pontes de hidrogênio entre rCV2736 e o tetrassacarídeo (GlcNAc-MurNAc)₂

rCV2736		Ligante		Ligação
Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distancia (Å)
Glu ¹¹⁰	O4	GlicNAc +1	OE2	3.0
Glu ¹¹⁰	OE1	GlicNAc +1	O3	3.6
Asn ⁷²	H	GlicNAc+1	O6	2.9
Tyr ²¹⁸	HH	GlicNAc+1	O7	2.1
Tyr ⁵	HH	GlicNAc-2	O3	2.2
Tyr ²¹⁶	HH	GlicNAc-2	O4	3.2
Met ²²⁸	H08	GlicNAc-2	O6	3.3
Gly ⁷¹	H02	MurNAc-1	O6	3.6
Phe ²⁹	H07	MurNAc-1	O11	2.6

Pose utilizada para as identificações: 14

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 14 - Pontes de hidrogênio entre rCV2736 e o tetrassacarídeo (GlcNAc)₄

rCV2736		Ligante		Ligação
Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distancia (Å)
Asn ¹⁵⁵	HD21	GlicNAc +2	O1	2.6
Ala ¹⁴⁴	O7	GlicNAc +2	H	2.7
Tyr ¹⁷⁵	O	GlicNAc+2	O3	3.4
Glu ¹¹⁰	OE1	GlicNAc+1	O4	3.1
Asp ¹⁷⁶	OD2	GlicNAc+1	O5	3.6
Asp ¹⁰⁸	OD2	GlicNAc-1	O7	3.3
Tyr ²¹⁸	HH	GlicNAc-1	O6	2.7
Asn ⁷²	H	GlicNAc-2	O7	3.1

Pose utilizada para as identificações: 09

Fonte: elaborada pela autora.

7 DISCUSSÃO

O uso de proteínas recombinantes como fármacos é uma das alternativas a terapêutica de várias doenças na atualidade. Nesse contexto, mecanismos que facilitem a produção em larga escala e a purificação desses produtos são de extrema importância. A rCV2736 é uma proteína recombinante, cuja ORF foi proveniente do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 e obtida após o sequenciamento do mesmo. A proteína recombinante foi produzida em células de *P. pastoris* KM71H e purificada por cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenil Sepharose, sendo obtida nas frações cromatográficas contendo 0,6 e 0,3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

P. pastoris (*Komagataella pastoris*) é uma levedura metilotrófica já bastante utilizada na produção de proteínas heterólogas desde a década de 1970, onde tornou-se amplamente utilizada para fins industriais devido à presença do promotor do gene referente à enzima álcool oxidase (AOX1), promotor este que é induzido e regulado através da presença de metanol. Devido à utilização destes promotores e de seu mecanismo de regulação, o estágio de crescimento de biomassa celular do hospedeiro é desacoplado da fase de expressão de proteína recombinante, o que diminui o estresse da cultura em ter acúmulo de proteínas recombinantes durante sua fase de crescimento, fazendo com que seja possível a produção de proteínas tóxicas para o próprio hospedeiro de expressão (AHMAD et al., 2014).

Outro fator importante sobre a expressão de proteínas em *P. pastoris* como sistema é a possibilidade de secreção da proteína heteróloga e a maior capacidade de realizar respiração celular em relação ao crescimento com fermentação em cultura. Apesar de ser um sistema mais caro que os sistemas procariotos como *Escherichia coli*, após o estabelecimento das condições de produção da proteína recombinante, os custos se tornam equiparáveis. Do mesmo modo, *P. pastoris* se torna uma alternativa viável para a produção de proteínas eucariotas ao se comparar outros sistemas de expressão apropriados para essa finalidade, como células de insetos ou células de mamíferos (AHMAD et al., 2014; POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012). Além destes fatores, esta levedura também é capaz de realizar diversas modificações pós-traducionais, como glicosilações, importantes na produção de algumas proteínas eucariotas.

P. pastoris é vetor de expressão dos mais variados tipos de proteínas com diversas atividades biológicas, como por exemplo na expressão de subunidades de proteínas utilizadas como vacinas recombinantes (WANG; JIANG; WANG, 2016). Dentre as proteínas expressas em *P. pastoris* como candidatas a vacinas estão uma glicoproteína do envelope viral do vírus Epstein-Barr (EPV) (WANG et al., 2016); proteínas do envelope viral do vírus da Dengue (KAUSHIK et al., 2016; TRIPATHI et al., 2015); antígeno da neuraminidase do vírus da gripe

aviária (H5N1) (SUBATHRA et al., 2014); proteínas do capsídeo do papilomavirus humano (HPV) (BAZAN et al., 2009), dentre outras.

Em escala industrial, *P. pastoris* também é utilizada para produção de enzimas utilizadas na área alimentícia, como enzimas utilizadas durante o processo de preparo (auxiliares), aditivos e ingredientes (SPOHNER et al., 2015). Como exemplos, podemos citar a produção de alfa-amilase, utilizada na indústria têxtil, de papel e farmacêutica (LIU et al., 2012); Inulinase, utilizada nas indústria de alimentos, têxtil e farmacêutica, capaz de hidrolisar inulina e produzir frutoligossacarídeos (HE et al., 2014); e a Lactase, importante na produção de alimentos sem lactose (KATROLIA et al., 2011). Na indústria farmacêutica, proteínas utilizadas para tratamento de alergias, câncer e aterosclerose também utilizam *P. pastoris* como sistema de expressão (WEINACKER et al., 2014).

Proteínas com potencial antimicrobiano também são produzidas utilizando *P. pastoris* como sistema de produção, como por exemplo peptídeos antimicrobianos (DENG et al., 2017). Várias proteínas de diversas fontes também são produzidas nas células desta levedura, dentre elas as quitinases. Várias quitinases recombinantes produzidas em *P. pastoris* apresentam as mais variadas atividades biológicas, como potencial antifúngico (LANDIM et al., 2017), potencial alergenicidade (VOLPICELLA et al., 2017), atividade nematocida (GAN et al., 2007), dentre outras atividades.

No caso de rCV2736, não foi possível o processo de purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma matriz contendo metais imobilizados, tais como níquel, cobre e cobalto (dados não mostrados), provavelmente devido a arquitetura da proteína recombinante que não deixou exposta a cauda com 6 resíduos de histidina, produzida pela adição de resíduos pelo vetor de expressão (pPICZ α A). Outro mecanismo utilizado foi a cromatografia por afinidade a quitina, onde não houve êxito no processo de purificação devido a baixa ligação de rCV2736 a quitina. Devido a esses fatores, outros métodos foram avaliados, e a alternativa de purificação escolhida foi a cromatografia de interação hidrofóbica, o que demonstra a necessidade de se compreender as características da proteína de modo a elaborar protocolos otimizando tempo e custos, como características relacionadas à composição de aminoácidos, ponto isoelétrico, dentre outras (WINGFIELD, 2015).

O uso de *tags* que facilitam o processo de purificação, tais como caudas de histidina com quantidades diferentes de resíduos, em cromatografias de afinidade com metal imobilizado é bastante comum como estratégia para purificação de proteínas recombinantes (PINA; LOWE; ROQUE, 2014). Outras estratégias devem ser avaliadas nos passos de purificação, que devem considerar vários fatores decorrentes do processo global de produção de proteínas

recombinantes, o que pode elevar os custos de produção, quando se avalia em escala industrial (SANCHEZ-GARCIA et al., 2016).

A sequência N-terminal da rCV2736, determinada por degradação de Edman (EDMAN, 1949), foi **EAEAEFVLAYYSGYAGNYAALTRYAASFNAVAV**, onde foi possível determinar as regiões incluídas pelo plasmídeo de expressão pPICZ α A, tais como os sítios de clivagem das proteases Kex2 e Ste13 (EAEA), enzimas do metabolismo de *P. pastoris* responsáveis pelo processamento pós-traducional responsáveis pela retirada do peptídeo sinal (fator α de *Saccharomyces cerevisiae* adicionado pelo plasmídeo de expressão), bem como os resíduos de aminoácidos do sítio de clonagem para a endonuclease de restrição *EcoRI* (EF).

A proteína recombinante apresentou 3 isoformas após avaliação por SDS-PAGE, com massas moleculares aparentes de aproximadamente 42, 38 e 36 kDa (MEDEIROS, 2012), que foram identificadas por espectrometria de massas. Acredita-se que essas diferentes massas ocorreram devido a glicosilações que foram adicionadas a sua molécula pelo hospedeiro de expressão, a levedura *P. pastoris* KM71H, que foram detectadas através de reações de deglicosilação, bem como por espectrometria de massas. Nestes ensaios foi possível observar glicosilações presentes na estrutura da proteína, principalmente em relação a banda com massa aparente de ~ 42 kDa o que confirma a hipótese de Medeiros (2012). O uso de culturas de *P. pastoris* como plataformas para expressão de proteínas recombinantes com resíduos de glicanos requeridos na estrutura é bastante conhecido, como por exemplo na expressão de anticorpos IgGs humanizados, onde as culturas de *P. pastoris* foram glicoengenheiradas para produção destes anticorpos com glicanos específicos (LI et al., 2006), bem como na obtenção de aquaporinas humanas glicosiladas com maior termoestabilidade quando comparadas a proteínas nativas (OBERG et al., 2011). *P. pastoris* é capaz de realizar glicosilações do tipo N e do tipo O ligadas, com a inclusão de resíduos do tipo *high*-manose, com auxílio de manosiltransferases presentes em seu complexo de Golgi (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999). Quitinases glicosiladas já foram relatadas na literatura, sendo produzidas em células de *P. pastoris*. A quitinase de *Glaciozyma antártica*, quando produzida em *P. pastoris*, apresentou-se N-glicosilada, após detecção por coloração diferencial para resíduos de N-glicanos, o que corroborou com o fato da mesma apresentar possíveis sítios de N-glicosilação após avaliação da sua sequência de aminoácidos (RAMLI et al., 2011).

Os resíduos de glicanos adicionados pelo hospedeiro de expressão são capazes de alterar a massa molecular aparente, predita através da sequência de aminoácidos, da proteína recombinante expressa. AKOND et al (2014) descreveram a produção de uma quitinase de *Dioscorea opposita* Thunb, em *Pichia pastoris* X-33. Esta proteína foi produzida glicosilada,

apresentando várias bandas protéicas ativas com massas moleculares aparentes variando de 28 a 58 kDa, após zimografia *in gel* para atividade quitinásica.

Os resíduos de glicanos adicionados por hospedeiros de expressão são importantes para a produção de glicoproteínas terapêuticas nestas plataformas. Geralmente, células de mamíferos são utilizadas como vetores de expressão de proteínas humanas, porém alternativas com relativo baixo custo para produção de glicoproteínas em maiores escalas são importantes, como a produção em células de fungos. O controle das vias de glicosilação e a humanização dos resíduos de glicanos que serão incorporados às proteínas recombinantes produzidas são estratégias para a utilização de organismos como *Pichia pastoris* na expressão de proteínas com fins terapêuticos (NETT et al., 2013).

A rCV2736 apresentou aumento de 47,1 U na atividade quitinolítica (BOLLER, 1992) quando o tempo de incubação com o substrato foi aumentado de 1 h para 24 h, porém quando adicionadas concentrações crescentes de NaCl durante a atividade não houve aumento da atividade em relação ao controle. Esperava-se obter um efeito do tipo *salting-out* quando da adição de NaCl, expondo os resíduos hidrofóbicos da proteína, na tentativa de facilitar a ligação a quitina coloidal, com conseqüente aumento da atividade quitinolítica. Como rCV2736 não possui domínio de ligação a quitina específico em sua estrutura, o que foi determinado por ferramentas de bioinformática (MEDEIROS, 2012) e modelagem por homologia, o tempo de incubação deve ser um fator crítico para a atividade enzimática desta proteína.

Os íons Ba^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} inibiram fortemente a atividade enzimática da rCV2736, em 78,13%, 67,32% e 71,07%. Nenhum dos íons testados foi capaz de potencializar a ação de rCV2736. Efeitos inibitórios relativos a metais que influenciam a atividade quitinolítica são relatados, como na quitinase CHI18H8 com potencial antifúngico, que teve sua atividade quitinásica inibida na presença de vários íons, tais como Ni^{2+} e Fe^{3+} (BERINI et al., 2017). Porém os autores concluíram que a enzima poderia ser dependente de Ca^{2+} , pois este potencializava a ação da referida enzima, e quando a mesma era tratada com EDTA, o efeito quelante suprimia a atividade enzimática, provavelmente pela necessidade de Ca^{2+} na estabilização da estrutura tridimensional da proteína recombinante, bem como do seu sítio ativo, o que já foi descrito para outras quitinases (BERINI et al., 2017; GARCÍA-FRAGA et al., 2014).

A rCV2736 foi capaz de hidrolisar peptidoglicanos da parede celular de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bem como foi ativa para *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *K. pneumonia* ATCC 10031 e *S. choleraesuis* ATCC 10708. Efeito bactericida foi constatado apenas para as cepas Gram-negativo *P. aeruginosa* e

K. pneumonia, para as outras cepas a rCV2736, nas concentrações testadas, apresentou efeito bacteriostático. Quitinases estão envolvidas nos processos de nutrição, ao possibilitar a utilização de quitina como fonte de carbono, parasitismo e defesa, principalmente devido sua ação antifúngica já bem descrita na literatura (RATHORE; GUPTA, 2015).

Porém em relação a atividade antibacteriana destas proteínas, relatos são mais escassos. Analisando a estrutura tridimensional das quitinases, em buscas por domínios relacionados à possível atividade antibacteriana, pode-se encontrar domínios similares, por exemplo, com Hevaminas, lisozimas ou domínio fibronectinas tipo III. As Hevaminas são um grupo de proteínas da família GH 18, capazes de hidrolisar tanto cadeias de quitina, quanto peptidoglicanos, possibilitando sua atuação na defesa contra bactérias patogênicas e fungos (CANTAREL et al., 2009). As fibronectinas são glicoproteínas de alto peso molecular relacionadas à vários eventos, dentre eles a adesão celular e à biomoléculas (KORNBLIHTT et al., 1985). O que classicamente se encontra na literatura para enzimas quitinolíticas, dentro das GHs, com atividade sobre peptidoglicanos são as lisozimas. Quitinases e lisozimas tem similar o fato da hidrólise por elas proporcionadas envolver ligações do tipo β -1,4 em polissacarídeos. As quitinases não possuem similaridade na sequência de aminoácidos com as lisozimas, porém ocorre uma similaridade na estrutura tridimensional do sítio catalítico dessas enzimas, o que é visto, por exemplo, nas quitinases da família GH 19 (ROBERTUS et al., 1998).

Poucos exemplos de quitinases com atividade antibacteriana são encontrados na literatura. Uma das primeiras descrições encontradas sobre quitinases com atividade antifúngica e antibacteriana foi em procariotos, para duas quitinases purificadas a partir do sobrenadante da cultura de *Pseudomonas aeruginosa* K-187(WANG; CHANG, 1997). Neste artigo, as quitinases apresentaram atividade sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* entre outros.

Chen et al. (2007) descreveram a produção de uma quitinase recombinante de *Carica papaya*, com atividade antifúngica e antibacteriana. A enzima recombinante foi capaz de inibir o crescimento de duas cepas de *E. coli*.

Ghasemi et al. (2011) produziram de forma recombinante quitinases de *Bacillus pumilus*, com atividade lisozima e quitinolítica, portanto, possuindo atividades potenciais antibacterianas e antifúngicas, respectivamente. Estes autores trazem o conceito de bifuncionalidade para as quitinases. Qin et al. (2014) e Elmogy et al. (2015) trazem ambos estudos com atividade antibacteriana de peptídeos e proteínas que apresentavam similaridade estrutural e enzimática com quitinases, o que ilustra a relação entre estrutura e função dentro do grupo das GHs. Os poucos relatos encontrados na literatura mostram a escassez de trabalhos

relativos ao potencial antibacteriano de enzimas quitinolíticas, pois a maioria descreve somente possíveis atividades antifúngicas para esse grupo de proteínas.

A rCV2736 apresentou efeito bactericida, nas concentrações testadas, sobre *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, dessa forma os demais experimentos foram realizados utilizando-se apenas essas duas cepas. *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* são Gram-negativo, patógenos oportunistas em infecções dos tratos urinário, podendo causar bacteremias em pacientes imunocomprometidos. Ambas estão relacionadas em casos de infecções hospitalares (MALDONADO et al., 2007; MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2014). *P. aeruginosa* pode ser encontrada em meios bióticos e abióticos. É uma bactéria móvel, não-fermentadora, possuindo como fatores de virulência principais a capacidade de formar biofilmes e a resistência intrínseca a várias substâncias (BALASUBRAMANIAN et al., 2013). *K. pneumoniae* é uma bactéria encapsulada, fermentadora, não móvel, podendo ser encontrada em vários ambientes como solo e água, possui diversos fatores de virulência, como a expressão de carbapenemase (KPC), produção de fimbrias que auxiliam na instalação da infecção em vários tecidos, lipopolissacarídeos e sideróforos (CDC, 2012; PACZOSA; MECSAS, 2016).

Os experimentos microbiológicos foram realizados com caldo Muller-Hinton em pH 5,2, estando a proteína recombinante em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2. O efeito bactericida foi observado nessas condições, porém quando se aumenta o valor de pH do meio de cultura, observa-se uma redução dessa atividade, elevando os valores de CIM de rCV2736 para as cepas testadas, comprovando a diminuição da atividade em relação ao aumento do pH do meio de cultura. Este fato pode ser explicado pelo caráter ácido desta enzima, que pode ser relacionado com o pH ótimo para a atividade enzimática entre 3,0 e 5,0 (MEDEIROS, 2012). Exemplos de quitinases da família GH 18 com caráter ácido são encontradas na lágrima humana, sendo conhecidas como quitinases ácidas de mamíferos. Estas tem pH ótimo variando de 2,0 a 4,0, sendo produzidas em conjunto com lisozimas, formando o filme lacrimal (BUCCOLO et al., 2011). A quitinase recombinante obtida a partir de uma biblioteca metagenômica, com similaridade a quitinases de *Aeromonas* sp. que habitam comumente solo, apresentou-se estável em pH 4,0 a 9,0, porém com atividade ótima em pH 5,0 (THIMOTEO et al., 2017).

Estudos mostram que o pH urinário, por ser ácido, favorece o desenvolvimento de mecanismos de resistência a infecções por *K. pneumoniae*. Tratamentos com fluorquinolonas, como ciprofloxacino, podem não ser efetivos devido a sua menor atividade antibacteriana em pH ácido. Bactérias como *P. aeruginosa* e *E. coli* que apresentam resistência a antibióticos de uso oral, quando testadas em pH sérico (na faixa da neutralidade) e em concentrações utilizadas

para tratamento de problemas urinários, acabam se tornando mais susceptíveis do que quando estas bactérias foram incubadas em meio com pH urinário, o que acaba superestimando os valores de resistência relacionada a infecções urinárias (CUNHA, 2016).

Com relação ao efeito do tempo de exposição, a CBM (365 µg/mL) da rCV2736 foi capaz de inviabilizar o crescimento de *P. aeruginosa* rapidamente após de 4 h de exposição. Para a cepa *K. pneumoniae*, o efeito bactericida foi evidenciado após 8 h de exposição à CBM (365 µg/mL), onde também se observou um efeito bacteriostático das culturas tratadas com a CIM em até 12 h de exposição. Esse efeito foi mantido por até 12h de exposição com a concentração subinibitória testada (91,45 µg/mL).

A proteína recombinante foi capaz de modular positivamente (efeito sinérgico) a atividade antimicrobiana da tetraciclina sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031. A tetraciclina é um antibiótico da classe das tetraciclinas com função bacteriostática, que tem como mecanismo de ação impedir a síntese proteica por se ligar a subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Cepas selvagens de *P. aeruginosa*, possuem um sistema de efluxo que é induzido por concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos e outras substâncias que se ligam a ribossomos (como as tetraciclinas, por exemplo), o que faz com que estas cepas tenham níveis de resistência a alguns destes antimicrobianos (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2014). As cepas utilizadas (*P. aeruginosa* ATCC 9027 e *K. pneumoniae* ATCC 10031) apresentaram sensibilidade à tetraciclina, e no ensaio de modulação provavelmente rCV2736, por sua ação sobre a degradação da parede celular bacteriana, evidenciada através de sua atividade peptidoglicano hidrolase positiva já descrita, levou a uma maior concentração de tetraciclina no interior das células, o que facilitou sua ação no processo de impedimento da síntese de proteínas, mesmo estando este antibiótico em concentrações subinibitórias.

A rCV2736 quando associada à ceftazidima também apresentou efeito sinérgico sobre *P. aeruginosa*. Ceftazidima é um antibiótico do grupo das cefalosporinas, que tem como modo de ação a ligação irreversível a transpeptidases, que impedem a formação das ligações cruzadas no peptidoglicano (MADIGAN, 2004), o que pode ter atuado em conjunto com a atividade de degradação da parede celular bacteriana de rCV2736, que facilitaria a entrada do antibiótico mencionado no interior da célula, aumentando o potencial de desestabilizar a parede celular bacteriana pela não formação das ligações cruzadas da molécula de peptidoglicano. Já para *K. pneumoniae*, a associação de rCV2736 com amicacina, um aminoglicosídeo inibidor de síntese protéica, com mecanismo similar à tetraciclina também foi de efeito sinérgico.

Ao investigar a ação da rCV2736 sobre biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, foi evidenciada a capacidade da proteína em inibir a formação de biofilme das

duas cepas, porém, nas concentrações testadas, não foi constatada a erradicação do biofilme já formado. No entanto, concentrações de proteína iguais a 2x CIM e 4xCIM, determinaram uma redução do crescimento bacteriano de 17,84% e 22,94%, para *P. aeruginosa*, e de 22,68% e 27,6% para *K. pneumoniae*, respectivamente.

Por definição, biofilmes são formados pela associação de células de microrganismos que estão envoltas em uma matriz extracelular polimérica (VERT, 2012). Biofilmes bacterianos são considerados fatores de virulência por impedir a ação de substâncias antimicrobianas ao dificultar o contato destas com as células que se dispõem organizadas em camadas unidas por uma matriz extracelular complexa (FLEMMING et al., 2016). Em um estudo que avaliava a capacidade de isolados clínicos de *K. pneumoniae* em formar biofilme, cepas isoladas de catéteres urinários foram os organismos com maior capacidade de formação de biofilme (MALDONADO et al., 2007).

Nossos resultados sugerem que a rCV2736 é capaz de degradar ou desestabilizar a estrutura de algum exopolissacarídeo da matriz do biofilme, como por exemplo a molécula de alginato presente no biofilme de *P. aeruginosa* (PUREVDORJ-GAGE, 2004). Este polissacarídeo é formado pela união de moléculas de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, unidos por ligação glicosídica do tipo β -1,4 (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; DA SILVA, 2008). É possível que rCV2736 iniba a formação do biofilme por reconhecer e clivar as ligações β -1,4 presentes nas moléculas de polissacarídeos.

Devido a composição da matriz do biofilme conter polissacarídeos e proteínas diversas, as quitinases podem ser consideradas possíveis ferramentas de uso para o tratamento de biofilmes bacterianos. O tratamento do biofilme de *Gardnerella vaginalis* com quitinases causou pouca redução no biofilme formado, quando comparado com outras moléculas, como proteases (proteínase K e tripsina) (PATTERSON et al., 2007). Já a quitinase endógena de *Francisella tularensis* atuou com fator negativo sobre a formação de biofilmes, evidenciando a presença de polissacarídeos na formação da matriz desta estrutura (CHUNG et al., 2014). Além de enzimas que podem degradar a matriz do biofilme, outras substâncias que regulam negativamente ou inibem o processo de *quórum sense* (QS) também são interessantes ferramentas no controle da formação de biofilmes bacterianos, e conseqüentemente a resistência de microrganismos a antimicrobianos (HUSAIN et al., 2013, 2017; HUSAIN; AHMAD, 2013). Estudos mais aprofundados sobre o real papel de quitinases no mecanismo de formação e inibição de biofilmes bacterianos são necessários.

A rCV2736 possui similaridade estrutural com proteínas relacionadas à esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* CFLE (*Cortical fragment-lytic enzyme*) (MEDEIROS, 2012).

A glicosidase relacionada à esporulação (*ydhD*) de *Bacillus subtilis* (PDB: 3CZ8) foi utilizada no processo de modelagem molecular por homologia de rCV2736, obtendo-se uma proteína com arquitetura do tipo barril TIM, característico das GH 18, porém apresentando duas mutações pontuais no seu sítio catalítico (no resíduo 104 houve uma mutação de aspartato para serina, e no resíduo de aminoácido 107 de ácido aspártico para asparagina). A escolha por este molde ocorreu devido a maior identidade obtida através do servidor Phyre2.0. Uma relação entre quitinases bifuncionais e as hidrolases de peptidoglicanos (PHs) pode ocorrer, visto que PHs podem ter como alvo diferentes porções da molécula do peptidoglicano, dentre estas a parte glicosídica envolvendo as moléculas de ácido N-acetilmurâmico e a N-acetil-D-glucosamina, unidas também por ligações do tipo β -1,4, do mesmo modo que a encontrada formando o polissacarídeo quitina. PHs que clivam a porção glicosídica do peptidoglicano podem ser classificadas como N-acetilglucosaminidases, lisozimas e transglicosilases líticas (VOLLMER et al., 2008b).

Devido a esta similaridade, experimentos de *docking* molecular foram realizados com o modelo de rCV2736 utilizando como ligantes um tetrassacarídeo de N-acetil-D-Glucosamina [(GlicNac)₄] e um tetrassacarídeo contendo unidades de N-acetil-D-Glucosamina alternadas com unidades de ácido N-acetilmurâmico [(GlcNAc-MurNAc)₂]. Energias de afinidade teóricas foram determinadas, variando de -7,0 a -6,5 kcal/mol para *docking* realizado com [(GlcNAc-MurNAc)₂] e -7,1 a -6,2 kcal/mol para [(GlicNac)₄], onde foi possível visualizar também a interação entre o resíduo responsável pela catálise (Glu¹¹⁰) e o átomo de oxigênio da ligação glicosídica formada entre os resíduos de carboidrato alocados nos subsítios +1 e -1 da enzima. A quitinase de *Serratia marcescens* (ChiB), por sua vez, apresentou uma energia livre de -7,4 kcal/mol, em experimentos de calorimetria, quando complexada com uma molécula de [(GlicNac)₄] (NORBERG et al., 2010), o que valida o processo de *docking molecular* realizado. Os valores de energia encontrados para [(GlicNac)₄] são mais baixos quando comparados a energia de ligação de uma quitinase com mais alta atividade quitinolítica, como a quitinase de *Vigna unguiculata* da família GH 19, cujos valores encontrados para ligação a vários oligômeros diferentes variou de -8,1 a -8,7 kcal/mol (LANDIM et al., 2017). Evidências mostram que a energia livre de ligação seja diretamente proporcional a processividade da enzima nas famílias de GHs, sendo essa relacionada a arquitetura do sítio ativo (PAYNE et al., 2013). Mais estudos relativos dinâmica molecular de CV2736 são necessários para se compreender o real mecanismo de catálise dos ligantes aqui descritos, auxiliando assim o entendimento do efeito antibacteriano encontrado.

Além do potencial antibacteriano, rCV2736 apresentou-se ativa contra a cepa Y de *T. cruzi* nas formas epimastigota e tripomastigota, em ensaios de atividade *in vitro*, com $IC_{50} = 1089 \mu\text{g/mL}$ para as formas epimastigotas e $118,3 \mu\text{g/mL}$ para tripomastigotas.

T. cruzi é o parasita responsável pela Doença de Chagas, tripanossomíase de ampla importância para a saúde pública. Sua distribuição ocorre prioritariamente na porção continental da América Latina, porém devido a alta mobilidade por todo mundo, outros países da Europa e América do Norte já apresentam casos. O modo de transmissão ocorre principalmente pelo contato com fezes e urina dos insetos triatomíneos hematófagos, geralmente de hábitos noturnos, contaminados com o parasita. Acredita-se que de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com esse parasita e os custos para tratamento dessa doença ainda são elevados. Os fármacos de escolha para o tratamento são benznidazol e nifurtimox (este teve sua produção e comercialização proibida no Brasil nos anos 80) (BEZERRA; DE OLIVEIRA MENEGUETTI; CAMARGO, 2012), porém quanto mais tempo a pessoa apresenta a infecção menor é a eficácia dos medicamentos, além disso em 40% dos pacientes tratados foram observados efeitos colaterais (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017; WHO, 2017).

Por esse motivo, é importante a busca por novos alvos terapêuticos que apresentem menor toxicidade e maior eficácia em todos os estágios da doença. Na literatura encontramos estudos sobre quitinases envolvidas no combate a Doença de Chagas, porém em relação a um possível controle populacional dos insetos transmissores, visto que estes possuem quitina compondo a sua membrana peritrófica intestinal, e essas enzimas quitinolíticas poderiam atuar causando danos nos processos de nutrição dos insetos (ALVARENGA et al., 2016). Possíveis efeitos de quitinases recombinantes sobre *T. cruzi* ainda não foram relatados, sendo importante a elucidação do modo de ação de rCV2736 sobre este parasita. Uma hipótese para a possível atividade desta proteína sobre o parasita é uma possível desestabilização celular desencadeada pelo reconhecimento da proteína ou dos glicanos presentes em sua estrutura, que levaria a um mecanismo de morte celular. Ensaios complementares de citotoxicidade são necessários de modo a caracterizar a proteína recombinante como uma possível substância candidata no combate à doença de chagas.

Diante dos resultados encontrados para os ensaios *in vitro*, rCV2736 pode ser considerada uma molécula com potencial antibacteriano, com possível mecanismo de ação a degradação enzimática do peptidoglicanos presente na parede celular bacteriana. rCV2736 também pode ser considerada uma molécula com potencial antiparasitário, atuando contra as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*. Ensaios complementares de citotoxicidade *in*

vitro e *in vivo* são necessários, bem como a possibilidade de formulações de uso tópico ou oral no tratamento a infecções bacterianas e da doença de Chagas, de modo a caracterizar rCV2736 como um possível antimicrobiano e tripanocida de uso clínico.

8 CONCLUSÃO

Diante do exposto, a proteína recombinante rCV2736 de *C. violaceum* ATCC 12472, produzida a partir de células de *P. pastoris* KM71H, é uma *chitinase-like* bifuncional com potencial enzimático e antibacteriano, atuando principalmente contra bactérias Gram-negativo, como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Com relação a sua atividade antibacteriana, rCV2736 também foi capaz de inibir a formação de biofilmes para ambas as bactérias, bem como de modular positivamente a ação de importantes antimicrobianos de uso clínico. Além disso, a rCV2736 também foi ativa sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, apresentando efeito antiparasitário *in vitro*. Seu mecanismo de ação antibacteriano pode ser explicado pelo efeito enzimático sobre a molécula do peptidoglicanos, presente na parede celular bacteriana, avaliado através de zimografia e simulações de *docking* molecular. Portanto, rCV2736 pode ser considerada como uma molécula com potencial antibacteriano e antiparasitário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADADE, C. M.; CHAGAS, G. S. F.; SOUTO-PADRÓN, T. Apis mellifera venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1444–1461, set. 2012.
- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- AKOND, M. A. et al. Characterization of a yam class IV chitinase produced by recombinant *Pichia pastoris* X-33. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 2, p. 222–230, 1 fev. 2014.
- ALVARENGA, E. S. L. et al. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 61–70, fev. 2016.
- AROSIO, M. et al. *Chromobacterium violaceum* lymphadenitis successfully treated in a Northern Italian hospital. **The New Microbiologica**, v. 34, n. 4, p. 429–432, out. 2011.
- BALASUBRAMANIAN, D. et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–20, jan. 2013.
- BAQUERO, F. The 2010 Garrod Lecture: The dimensions of evolution in antibiotic resistance: Ex unibus plurum et ex pluribus unum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1659–1672, 2011.
- BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 12, p. 482–487, dez. 1997.
- BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology**. [s.l.] Mosby, 1994.
- BASSETTI, M. et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. **Intensive Care Medicine**, 21 jul. 2017.
- BAZAN, S. B. et al. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Archives of virology**, v. 154, n. 10, 2009.
- BERINI, F. et al. Production and characterization of a novel antifungal chitinase identified by functional screening of a suppressive-soil metagenome. **Microbial Cell Factories**, v. 16, 31 jan. 2017.
- BEZERRA, W. S.; DE OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U.; CAMARGO, L. M. A. A busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v. 38, n. 1, p. 09–20, 2012.
- BLAKE, C. C. et al. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. **Nature**, v. 206, n. 4986, p. 757–761, 22 maio 1965.

BRETTAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 30 (Pt 3), p. 193–200, dez. 1999.

BUCOLO, C. et al. Acidic Mammalian Chitinase and the Eye: Implications for Ocular Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, 2011.

CAMARGO, E. P. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 6, p. 93–100, jun. 1964.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D233–238, jan. 2009a.

CASTRO, D. et al. Proteomic analysis of *Chromobacterium violaceum* and its adaptability to stress. **BMC Microbiology**, v. 15, 1 dez. 2015.

CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 89–188, 2010.

CHEN, Y.-T. et al. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 714–722, 7 fev. 2007.

CHUNG, M.-C. et al. Chitinases Are Negative Regulators of *Francisella novicida* Biofilms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 24 mar. 2014.

CUNHA, B. A. An infectious disease and pharmacokinetic perspective on oral antibiotic treatment of uncomplicated urinary tract infections due to multidrug-resistant Gram-negative uropathogens: the importance of urinary antibiotic concentrations and urinary pH. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 4, p. 521–526, 1 abr. 2016.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773–782, 21 jul. 2006.

DAVIES, G. J.; WILSON, K. S.; HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 321, n. 2, p. 557–559, 15 jan. 1997.

DENG, T. et al. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. **Protein Expression and Purification**, v. 140, n. Supplement C, p. 52–59, 1 dez. 2017.

DE VASCONCELOS, A. T. R. et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 11660–11665, 2003.

DOSLER, S.; KARAASLAN, E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 62, p. 32–37, dez. 2014.

DUFOUR, D.; LÉVESQUE, C. M. Zymogram Assay for the Detection of Peptidoglycan Hydrolases in *Streptococcus mutans*. [s.d.].

DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, set. 2016.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical reviews in microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001.

DURHAM-COLLERAN, M. W.; VERHOEVEN, A. B.; VAN HOEK, M. L. *Francisella novicida* Forms In Vitro Biofilms Mediated by an Orphan Response Regulator. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 3, p. 457–465, 1 abr. 2010.

EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. **Archives of Biochemistry**, v. 22, n. 3, p. 475, jul. 1949.

ELMOGY, M. et al. Isolation, Characterization, Kinetics, and Enzymatic and Nonenzymatic Microbicidal Activities of a Novel c-Type Lysozyme from Plasma of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 57–57, 13 maio 2015.

EMSLEY, P. et al. Features and development of *Coot*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 1 abr. 2010.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Micro**, v. 14, n. 9, p. 563–575, set. 2016.

FUNKHOUSER, J.; ARONSON, N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 96, 2007.

GAN, Z. et al. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 6, p. 1309–1317, out. 2007.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Bacterial alginate: technological aspects, characteristics and production. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, jan. 2008.

GARCÍA-FRAGA, B. et al. Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 2133–2143, 1 mar. 2014.

GENILLOUD, O. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 173–188, 1 jul. 2014.

GHASEMI, S. et al. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 225–231, 7 mar. 2011.

HANCOCK, R. E. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 209–218, abr. 2005.

HE, M. et al. Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 105–114, jan. 2014.

- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. Pt 3, p. 781, 1993.
- HINTZE, B. J. et al. Molprobity's ultimate rotamer-library distributions for model validation: MolProbity's Ultimate Rotamer-Library. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 84, n. 9, p. 1177–1189, set. 2016.
- HOOFT, R. W. et al. Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, n. 6580, p. 272, 23 maio 1996.
- HUANG, Q.-S. et al. The GH18 Family of Chitinases: Their Domain Architectures, Functions and Evolutions. **Glycobiology**, v. 22, n. 1, p. 23–34, 1 jan. 2012.
- HUSAIN, F. M. et al. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Biosciences**, v. 38, n. 5, p. 835–844, dez. 2013.
- HUSAIN, F. M. et al. Leaf Extracts of *Mangifera indica* L. Inhibit Quorum Sensing - Regulated Production of Virulence Factors and Biofilm in Test Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 727, 2017.
- HUSAIN, F. M.; AHMAD, I. Doxycycline interferes with quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation in gram-negative bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 949–957, jun. 2013.
- ISELI, B. et al. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1-2, p. 186–188, mar. 1996.
- JAYARAMAN, P. et al. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Int J Biol Sci**, v. 6, n. 6, p. 556–568, 2010.
- KATROLIA, P. et al. Molecular cloning and high-level expression of a β -galactosidase gene from *Paecilomyces aeruginus* in *Pichia pastoris*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 3, p. 112–119, 1 maio 2011.
- KAUSHIK, N. et al. Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnology**, v. 16, 4 fev. 2016.
- KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, jun. 2015.
- KESSLER, R. L. et al. *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55497, 31 jan. 2013.
- KO, J. et al. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W294–W297, 1 jul. 2012.
- KOPPARAPU, N. K. et al. Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1370–1374, jun. 2011.

KORNBLIHTT, A. R. et al. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 7, p. 1755–1759, jul. 1985.

KOTA, P. et al. Gaia: automated quality assessment of protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2209–2215, 15 ago. 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, Agosto 1970.

LAMBERT, E. A.; SHERRY, N.; POPHAM, D. L. In vitro and in vivo analyses of the *Bacillus anthracis* spore cortex lytic protein SleL. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 5, p. 1359–1368, maio 2012.

LANDIM, P. G. C. et al. Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. **Biochimie**, v. 135, p. 89–103, abr. 2017.

LAYEC, S.; DECARIS, B.; LEBLOND-BOURGET, N. Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 7, p. 507–515, 1 set. 2008.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D302–D305, 3 nov. 2011.

LI, H. et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 210–215, fev. 2006.

LIU, Z. W. et al. Constitutive expression of barley α -amylase in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 5805–5810, maio 2012.

LI, Z.; NAIR, S. K. Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? **Protein Science**, v. 21, n. 10, p. 1403–1417, out. 2012.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 1 jan. 2016.

MALDONADO, N. C. et al. A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Formatex, 2007.

MALINIČOVÁ, L. et al. Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. The Formatex Microbiology Book Series. Volume, v. 1, 2010.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database issue, p. D225–229, jan. 2011.

- MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum* in a child from Colombia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 391–393, 2007.
- MCADAMS, D. Resistance diagnosis and the changing epidemiology of antibiotic resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1388, n. 1, p. 5–17, 1 jan. 2017.
- MCAULIFFE, G. N.; HENNESSY, J.; BAIRD, R. W. Relative Frequency, Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Chromobacterium violaceum*, and *Shewanella* spp. in the Northern Territory of Australia, 2000-2013. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 605–610, 4 mar. 2015.
- MEDEIROS, S. C. **Expressão heteróloga de uma glicosil hidrolase da Família 18 (CV2736) de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris* com potencial antibacteriano**. 2012. 120f. Dissertação (mestrado em bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Fortaleza, 2012.
- MOELLERING, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 2–9, jan. 2011.
- MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 648–656, dez. 1977.
- MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 8 jan. 2014.
- NETT, J. H. et al. Characterization of the *Pichia pastoris* Protein-O-mannosyltransferase Gene Family. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68325, 7 jan. 2013.
- NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116712, 2 nov. 2015.
- NORBERG, A. L. et al. Determination of substrate binding energies in individual subsites of a family 18 chitinase. **FEBS Letters**, v. 584, n. 22, p. 4581–4585, 19 nov. 2010.
- OBBERG, F. et al. Glycosylation Increases the Thermostability of Human Aquaporin 10 Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31915–31923, 6 jul. 2011.
- OVERHAGE, J. et al. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4176–4182, 1 set. 2008.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 80, n. 3, p. 629–661, 15 jun. 2016.
- PATTERSON, J. L. et al. Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 197, n. 2, p. 170.e1–170.e7, ago. 2007.
- PAYNE, C. M. et al. Glycoside hydrolase processivity is directly related to oligosaccharide binding free energy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 50, p. 18831–18839, 18 dez. 2013.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, 30 jun. 2017.

PERRAKIS, A. et al. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. **Structure (London, England : 1993)**, v. 2, n. 12, p. 1169–80, 15 dez. 1994.

PETERSEN, L. Catalytic strategies of glycoside hydrolases. 2010.

PINA, A. S.; LOWE, C. R.; ROQUE, A. C. A. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 366–381, 1 mar. 2014.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, Maio 2012.

PUNTA, M. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D290–D301, 29 nov. 2011.

PUREVDORJ-GAGE, B. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure, behavior and hydrodynamics. p. 1–134, 2004.

QIN, C. et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 362–370, dez. 2014.

RAMLÍ, A. N. M. et al. Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 94, 4 nov. 2011.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. **Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/er/2015/791907/>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

ROBERTUS, J. D. et al. Structural analysis shows five glycohydrolase families diverged from a common ancestor. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, n. 1-2, p. 127–132, 1998.

ROMEIRO, R. D. S.; ROMEIRO, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. 2007.

RUKHOLM, G. et al. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time–kill study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, p. 247–252, 1 mar. 2006.

SANCHEZ-GARCIA, L. et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microbial Cell Factories**, v. 15, 9 fev. 2016.

SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 5857–5864, 26 maio 1998.

SEIGEL, J. K. et al. *Chromobacterium violaceum* necrotizing fasciitis: a case report and review of the literature. **Ear, Nose, & Throat Journal**, v. 91, n. 11, p. 479–483, nov. 2012.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHIN, W.-H. et al. Prediction of protein structure and interaction by GALAXY protein modeling programs. **Bio Design**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2014.

SPOHNER, S. C. et al. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 118–134, 20 maio 2015.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 30–38, jan. 2015.

SUBATHRA, M. et al. Evaluation of antibody response in mice against avian influenza A (H5N1) strain neuraminidase expressed in yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biosciences**, v. 39, n. 3, p. 443–451, jun. 2014.

TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C. et al. Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. **Biochemistry**, v. 34, n. 48, p. 15619–15623, dez. 1995.

THEURETZBACHER, U. Resistance drives antibacterial drug development. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 433–438, out. 2011.

THIMOTEO, S. S. et al. A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 1, 5 jan. 2017.

TRIPATHI, L. et al. *Pichia pastoris*-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 23 set. 2015.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

UDAYA PRAKASH, N. A. et al. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 70, n. 5, p. 466–478, maio 2010.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277–283, abr. 2015.

VERT, M. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure Appl. Chem.**, v. 84, p. 377–410, 2012.

VOLLMER, W. et al. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 259–286, 2008a.

VOLLMER, W. et al. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 259–286, mar. 2008b.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 149–167, mar. 2008.

VOLPICELLA, M. et al. Characterization of maize chitinase-A, a tough allergenic molecule. **Allergy**, v. 72, n. 9, p. 1423–1429, set. 2017.

VUONG, T. V.; WILSON, D. B. Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 195–205, 15 jun. 2010.

WANG, M. et al. Expression and immunogenic characterization of recombinant gp350 for developing a subunit vaccine against Epstein-Barr virus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1221–1230, fev. 2016.

WANG, M.; JIANG, S.; WANG, Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. **Bioengineered**, v. 7, n. 3, p. 155–165, 31 maio 2016.

WANG, S. L.; CHANG, W. T. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 380–386, fev. 1997.

WEINACKER, D. et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1043–1048, 10 mar. 2014.

WHO. **WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 7 ago. 2017.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 80, p. 6.1.1–35, 1 abr. 2015.

WU, G. et al. Effects of Cations and PH on Antimicrobial Activity of Thanatin and s-Thanatin Against *Escherichia coli* ATCC25922 and *B. subtilis* ATCC 21332. **Current Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 552–557, 23 set. 2008.

YANG, C.-H.; LI, Y.-H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435–441, 1 out. 2011.

ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

1. ágar YPDS (*Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol*) (*Pichia Expression Kit - Invitrogen*)

Extrato de levedura 1%;

Peptona 2%;

Dextrose 2%;

Sorbitol 1M;

ágar 2%

2. caldo BMGY (*buffered complex glycerol medium*) (*Pichia Expression Kit -Invitrogen*)

Tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0;

Extrato de levedura 1%;

Peptona 2%;

YNB (*yeast nitrogen base*) 1,34%;

Biotina 4×10^{-5} %;

glicerol 1%

3. caldo BMMY (*buffered complex methanol medium*) (*Pichia Expression Kit - Invitrogen*)

Tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0;

Extrato de levedura 1%;

Peptona 2%;

YNB (*yeast nitrogen base*) 1,34%;

Biotina 4×10^{-5} %;

Metanol 1%

4. caldo LIT (*liver infusion tryptose*)

NaHPO₄.7H₂O 1,16%

NaCl 0,4%

KCl 0,04%

Glicose 0,22%

Triptose 0,5%
Caldo de infusão de fígado 0,5%
Extrato de levedura 0,15%
Hemina 25 mg/20 mL Tris base 0,1N
Soro fetal bovino 10%
Penicilina 20.000 U/100 mL
Estreptomicina/gentamicina 0,005%

5. caldo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

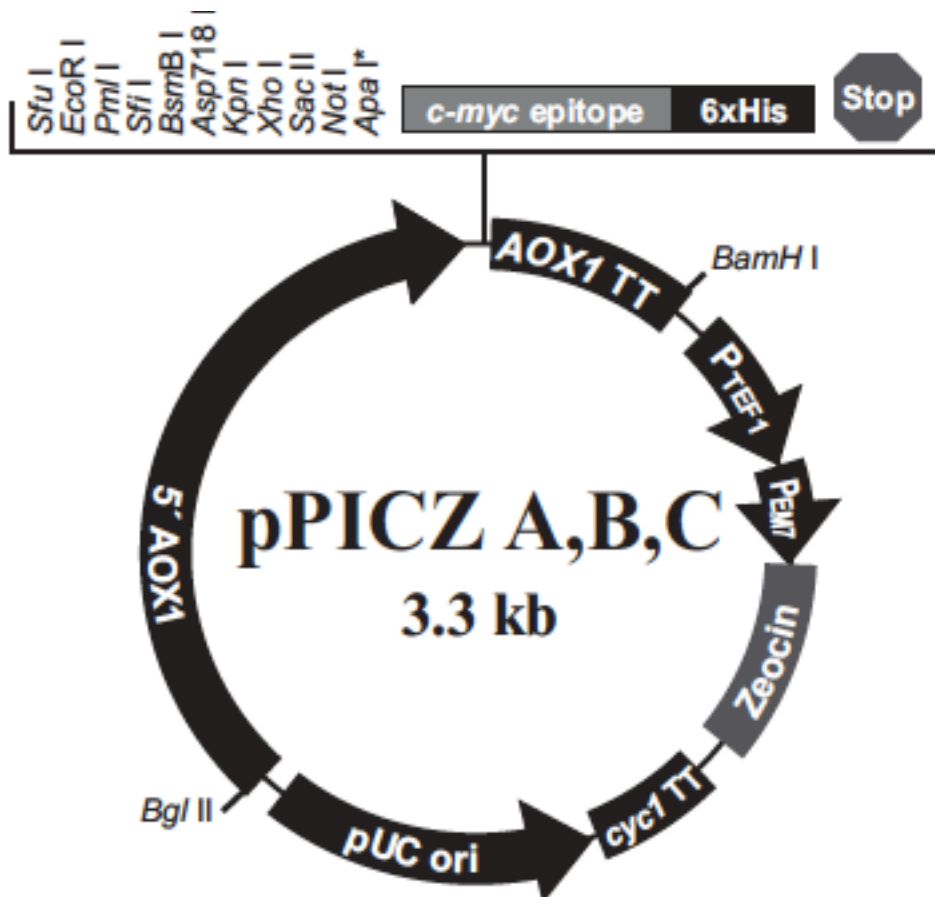
Meio liofilizado 1,015%
Nitrato férrico 0,0001%
Estreptomicina 100 U/mL
Penicilina 100 mg/mL
Soro fetal bovino 1%

ANEXO B - SEQUENCIA COMPLETA DE AMINOÁCIDOS DE rCV2736

EAEAEFVLAYYSGYAGNYAALTRYAASFNAVAVDFYNITAQGAVTGNGDPAPNDAI
SFLGRKIPAYGCVSNVDGNGNWSADIAHAVSTSAQSQAVANLVKFAQDKRFSGIN
VDFEAVAQGDRNNFSHFIQVLGRALHAKGLKLIVSVPAFSAKDENHPANYGYDLRA
LGAAADYLQIMSYDEAIPAWDPGPVAGSDWMEDDLDYAVERVPAAKILNGIPAYGY
DWKRPGDGGMLYWKDTQALIARYGAQPRYDAGTHSLTFNYGAADGSRHTVWTEN
ARSVALKASLVNAYGLGGTSLYALGMEDDAFWAAVKQGLAQRVLEQKLISEEDLNS
AVDHHHHHHH

Fonte: NCBI

ANEXO C - MAPA DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO pPICZ α A



Fonte: *Pichia Expression Kit* (Invitrogen)

ANEXO D - INFORMAÇÕES SOBRE *C. violaceum* ATCC 12472

***Chromobacterium violaceum* Bergonzini (ATCC® 12472™)**

Strain Designations: **MK [NCIB 9131, NCTC 9757]** / Type Strain: **yes** / Biosafety Level: **2**

SHARE | EMAIL | PRINT

GENERAL INFORMATION	CHARACTERISTICS	CULTURE METHOD	HISTORY	DOCUMENTATION
<p>Permits and Restrictions View Permits</p> <hr/> <p>Deposited As <i>Chromobacterium violaceum</i> Bergonzini</p> <hr/> <p>Strain Designations MK [NCIB 9131, NCTC 9757]</p> <hr/> <p>Application Produces restriction endonuclease <i>CviI</i> Serine hydroxymethyltransferase synthesis</p> <hr/> <p>Isolation Freshwater, Malaya</p> <hr/> <p>Biosafety Level 2</p> <p><i>Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</i></p> <hr/> <p>Product Format freeze-dried</p> <hr/> <p>Storage Conditions Frozen: -80°C or colder</p>	<p><i>Chromobacterium violaceum</i> Bergonzini ATCC® 12472™</p> <p>freeze-dried</p> <p>For-Profit: \$222.00 Non-Profit: \$188.70</p> <p>Qty: <input type="text"/></p> <p>Add to Cart</p> <hr/> <p>CUSTOMER SERVICE</p> <p>Don't see what you are looking for? Our Technical Support team may be able to help.</p> <p>Learn More</p>			

Fonte: <https://www.atcc.org/products/all/12472.aspx#generalinformation>

ANEXO E - AUTORIZAÇÃO DA CTNBIO (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA) PARA MANIPULAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS



10

ISSN 1677-7069

Diário Oficial da União - Seção 3

Nº 99, terça-feira, 27 de maio de 2014

Código da UG: 240113, Gestão: 00001, Fonte: 0100, Natureza de Despesa: Capital - Valor: R\$ 375.000,00 (trezentos e setenta e cinco mil reais). O referido termo tem a vigência de 02/06/2014 a 31/05/2015. Data da Assinatura: 26/05/2014 Assinam: André Tortato Rauen - Subsecretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa, CPF: 006.119.529-47 e Bruno Vaz Castilho de Souza CPF: 965.133.307-34.

Processo Nº: 01200.002176/2014-16 Espécie: Termo de Descentralização firmado entre o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI e o Observatório Nacional - ON. Convenientes: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - CNPJ 03.132.745/0001-00 e o Observatório Nacional - ON - UG: 240126 Objeto: Apoio a participação brasileira no SLOAN SKY Survey IV. Crédito Orçamentário: Funcional Programática 19.571.2021.20V7.0001.000V - Desenvolvimento de Novas Linhas de Pesquisa e Inovação nos Institutos de Pesquisa. Código da UG: 240113, Gestão: 00001, Fonte: 0100, Natureza de Despesa: Custeio Valor: R\$ 320.000,00 (trezentos e vinte mil reais). O referido termo tem a vigência de 28/05/2014 a 31/12/2014. Data da Assinatura: 26/05/2014 Assinam: André Tortato Rauen - Subsecretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa CPF: 006.119.529-47 e João Carlos Costa dos Anjos - Diretor do ON - CPF: 533.334.977-00.

Processo Nº: 01200.002175/2014-71 Espécie: Termo de Descentralização firmado entre o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI e o Instituto Nacional de Tecnologia - INT Convenientes: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - CNPJ 03.132.745/0001-00 e o Instituto Nacional de Tecnologia - INT - UG: 240104 Objeto: Apoio ao projeto "Instalação do cabeamento para a nova subestação do INT". Crédito Orçamentário: Funcional Programática 19.571.2021.20V7.0001.000A - Recuperação da Infraestrutura Física das Unidades de Pesquisa Código da UG: 240113, Gestão: 00001, Fonte: 0100, Natureza de Despesa: Capital Valor: R\$ 700.000,00 (setecentos mil reais). O referido termo tem a vigência de 28/05/2014 a 31/12/2014. Data da Assinatura: 26/05/2014 Assinam: André Tortato Rauen - Subsecretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa CPF: 006.119.529-47 e Domingos Manfredi Naveiro - Diretor do INT - CPF: 598.818.957-15.

CENTRO NACIONAL DE MONITORAMENTO E ALERTAS DE DESASTRES NATURAIS

AVISO DE ALTERAÇÃO PREGÃO Nº 8/2014

Comunicamos que o edital da licitação supracitada, publicada no DOU de 14/05/2014 foi alterado. Objeto: Pregão Eletrônico - Registro de Preços para eventual contratação de Serviço Telefônico Fixo Comutado (STFC), a ser executado de forma contínua nas dependências do Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais CEMADEN, localizado no Parque Tecnológico da cidade de São José dos Campos SP, visando atender às necessidades institucionais, conforme as especificações, condições e exigências estabelecidas neste Edital e seus anexos. Total de Itens Licitados: 00029 Novo Edital: 27/05/2014 das 08h00 às 12h00 e 13h00 às 17h00. Endereço: Rod. Presidente Dutra, S/n, Km 40 - Cachoeira Paulista Inpe - CACHOEIRA PAULISTA - SP. Entrega das Propostas: a partir de 27/05/2014 às 08h00 no site www.comprasnet.gov.br. Abertura das Propostas: 06/06/2014, às 14h00 no site www.comprasnet.gov.br.

CARLOS ALBERTO PEREIRA
Pregoeiro

(SIDE - 26/05/2014) 240101-00001-2014NE800001

CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA ELETRÔNICA AVANÇADA S/A

EXTRATO DE CONTRATO Nº 18/2014 - UASG 245209

Nº Processo: 01213000270201473. PREGÃO SISPP Nº 28/2014. Contratante: CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA ELETRÔNICA AVANÇADA S.A. CNPJ Contratado: 05370035000136. Contratado - PM TECH CONSULTORIA E ASSESSORIA - EMPRESARIAL SOCIEDADE. Objeto: Contratação de empresa especializada na prestação de serviço de treinamento In-Company de gerenciamento de projetos. Fundamento Legal: Lei 8.666/93. Vigência: 12/05/2014 a 12/11/2014, Valor Total: R\$26.900,00. Fonte: 100000000 - 2014NE800327. Data de Assinatura: 12/05/2014.

(SICON - 26/05/2014) 245209-24209-2014NE800044

EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 1/2014 - UASG 245209

Número do Contrato: 33/2013. Nº Processo: 01213000401201350. PREGÃO SISPP Nº 63/2013. Contratante: CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA ELETRÔNICA AVANÇADA S.A. CNPJ Contratado: 03257455000185. Contratado - PREDITIVA ANÁLISES EM ENERGIA - ELÉTRICA LTDA - ME. Objeto: Prorrogação, pelo período de 12 (doze) meses dos serviços de confecção anual de laudo e medições do sistema de proteção de descargas atmosféricas (SPDA). Fundamento Legal: Lei 8.666/93. Vigência: 21/06/2014 a 21/06/2014. Valor Total: R\$7.800,00. Fonte: 100000000 - 2014NE800390. Data de Assinatura: 21/05/2014.

(SICON - 26/05/2014) 245209-24209-2014NE800042

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00032014052700010

EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 2/2013 - UASG 245209

Número do Contrato: 78/2012. Nº Processo: 01213000227201264. PREGÃO SISPP Nº 122/2012. Contratante: CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA - ELETRÔNICA AVANÇADA S.A. CNPJ Contratado: 01092686000150. Contratado - JOHNSON CONTROLS BE DO BRASIL - LTDA. Objeto: Supressão de 10,8% de peças e serviços previstos inicialmente, bem como prorrogação contratual pelo período de 12 (doze) meses. Fundamento Legal: Lei 8.666/93. Vigência: 01/11/2013 a 01/11/2014. Valor Total: R\$382.701,70. Fonte: 100000000 - 2013NE801121. Fonte: 100000000 - 2013NE801121. Data de Assinatura: 01/11/2013.

(SICON - 26/05/2014) 245209-24209-2014NE800042

AVISO DE LICITAÇÃO PREGÃO Nº 45/2014 - UASG 250209

Nº Processo: 01213.004053/2014 - Objeto: Pregão Eletrônico - Aquisição de óculos de proteção com lentes gradadas. Total de Itens Licitados: 00003. Edital: 27/05/2014 de 08h30 às 12h00 e de 13h às 17h00. Endereço: Estrada Joao de Oliveira Remiao, 777 PORTO ALEGRE - RS. Entrega das Propostas: a partir de 27/05/2014 às 08h30 no site www.comprasnet.gov.br. Abertura das Propostas: 10/06/2014 às 09h00 no site www.comprasnet.gov.br.

JULIO EDUARDO SILVEIRA PEREIRA
Pregoeiro

(SIDE - 26/05/2014) 245209-24209-2014NE800031

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

EXTRATO DE INEXIGIBILIDADE DE LICITAÇÃO Nº 13/2014 - UASG 113202

Nº Processo: 01342000411201409 - Objeto: Renovação de licença pelo uso de software. Total de Itens Licitados: 00001. Fundamento Legal: Art. 25º, Caput da Lei nº 8.666 de 21/06/1993. Justificativa: O valor esta compatível com o valor de mercado. Declaração de Inexigibilidade em 02/05/2014. JOSE ANTONIO DIAZ DIEGUEZ, Ordenador de Despesas. Ratificação em 02/05/2014. JOSE CARLOS BRESSIANI, Superintendente. Valor Global: R\$ 31.028,13. CNPJ CONTRATADA: 00.796.437/0001-83 ENGINEERING SIMULATION AND SCIENTIFIC SOFTWARE LTDA.

(SIDE - 26/05/2014) 113202-11501-2014NE800060

AVISO DE LICITAÇÃO PREGÃO Nº 42/2014 - UASG 113202

Nº Processo: 01342000199201471 - Objeto: Pregão Eletrônico - Contratação de empresa para a prestação do serviço de engenharia que consiste na manutenção da cobertura dos Predílios 02 e 03 do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais COTM da CNEN/IPEN. Total de Itens Licitados: 00001. Edital: 27/05/2014 de 08h30 às 12h00 e de 12h às 16h30. Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2242. Cidade Universitária Butantã - SAO PAULO - SP. Entrega das Propostas: a partir de 27/05/2014 às 08h30 no site www.comprasnet.gov.br. Abertura das Propostas: 11/06/2014 às 14h00 no site www.comprasnet.gov.br. Informações Gerais: O edital encontra-se a disposição no site: www.comprasnet.gov.br

JOSE ANTONIO DIAZ DIEGUEZ
Coordenador de Área de Administração

(SIDE - 26/05/2014) 113202-11501-2014NE800060

INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL S/A

EXTRATO DE INEXIGIBILIDADE DE LICITAÇÃO

Processo: RMS GPOTM 2014/05/00002. Contratada: AREVA MINES. Objeto: Serviço de revisão do Projeto de Desenvolvimento das Lavras Subterráneas de Caetité / Bahia. Fundamento Legal: Inexigível de acordo com art. 25, Inciso II, § 1º c/c art. 13 Inciso II, da Lei 8.666/1993. Declaração do Ato: Hilton Mantovani Lima, Gerente de Produção em Caetité. Ratificação: Adriano Maciel Tavares, Diretor de Recursos Minerais, em 21.05.14.

RESULTADO DE JULGAMENTO PREGÃO ELETRÔNICO CADMTM Nº 5/2014

Em cumprimento ao disposto na Lei 10.520, de 17 de julho de 2002 e em conformidade com o parágrafo 1º do artigo 109 da Lei 8.666/93, Indústrias Nucleares do Brasil S.A. - INB toma público que a empresa Labsynth Produtos Para Laboratórios Ltda foi considerada vencedora no resultado final de julgamento das propostas apresentadas ao Pregão Eletrônico CADMTM nº 05/2014, cujo objeto é o fornecimento de equipamentos laboratoriais e acessórios.

RADIVAL DA COSTA NERY
Pregoeiro

INSTITUTO DE RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA

EXTRATO DE INEXIGIBILIDADE DE LICITAÇÃO Nº 70005/2014 - UASG 113204

Nº Processo: 00156/2014 - Objeto: Aquisição de Software Univ Grid Engine-Licença para uso. Total de Itens Licitados: 00001. Fundamento Legal: Art. 25º, Caput da Lei nº 8.666 de 21/06/1993. Justificativa: Fornecedor exclusivo. Declaração de Inexigibilidade em 26/05/2014. ROBERTO CRESPO PEREIRA, Chefe de Compras. Ratificação em 26/05/2014. JAYME DA COSTA GARCIA, Chefe Di-loja. Valor Global: R\$ 13.800,00. CNPJ CONTRATADA: Estrangeiro UNIVA.

(SIDE - 26/05/2014) 113204-11501-2014NE800019

EXTRATO DE INEXIGIBILIDADE DE LICITAÇÃO Nº 70006/2014 - UASG 113204

Nº Processo: 00177/2014 - Objeto: Participação no Programa de Inter-comparação - PROCORAD Total de Itens Licitados: 00001. Fundamento Legal: Art. 25º, Caput da Lei nº 8.666 de 21/06/1993. Justificativa: Fornecedor Exclusivo Declaração de Inexigibilidade em 26/05/2014. ROBERTO CRESPO PEREIRA, Chefe de Compras. Ratificação em 26/05/2014. JAYME DA COSTA GARCIA, Chefe Di-loja. Valor Global: R\$ 8.500,00. CNPJ CONTRATADA: Estrangeiro PROCORAD.

(SIDE - 26/05/2014) 113204-11501-2014NE800019

NUCLEBRÁS EQUIPAMENTOS PESADOS S/A

EXTRATO DE CONTRATO

Espécie: extrato do Contrato C-908/CS-500. Objeto: Prestação de serviços de Realização de concurso público de provas e títulos, incluindo o planejamento e a elaboração do edital do manual do candidato e das provas objetivas, destinado ao provimento de 62 vagas e cadastro reserva. Contrato firmado com dispensa de licitação com base no Artigo 24, XIII da Lei 8666/93. Contratada: Fundação Bio-Rio. CNPJ: 31.165.384/0001-26. Valor: 629.356,00. Prazo de vigência: 26/03/2014 a 25/03/2015. Data de assinatura: 26/03/2014. Signatários: pela NUCLEP: Paulo Roberto Trindade Braga - Diretor Administrativo e Ricardo Noronha Pereira - Gerente de Suprimentos. Pela Contratada: Gilberto Lima de Freitas - Secretário Geral e Angelo Luiz Monteiro de Barros - Presidente.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

EXTRATO PRÉVIO Nº 4100/2014

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que encontra-se em análise na Comissão o processo a seguir discriminado:

Processo nº 01200.004129/1998-53
Requerente: Universidade Federal do Ceará
CQB: 0102/99
Pregão: 22508/2014
Endereço: Av. Humberto Monte, 2977. Campus Pici - Fortaleza, Ceará. CEP 60450-000.

Assunto: Solicitação de parecer para extensão de CQB para instalações com nível de biossegurança NB-1.

Ementa: A Dra. Ana de Fátima Fontenelle Urano Carvalho, Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da Universidade Federal do Ceará - UFC, solicita a CTNBio análise quanto a nova composição da Comissão Interna de Biossegurança. O Magnífico Reitor da Universidade Federal do Ceará, Dr. Jesualdo Pereira Farias, através da Portaria nº 234 de 26 de janeiro de 2011, nomeia para compor a Comissão Interna de Biossegurança os seguintes membros: Dra. Ana de Fátima Fontenelle Urano Carvalho (Presidente), Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos, Dr. Thales Barbosa Grangeiro, Dra. Ilka Maria Vasconcelos, Dra. Maria Clélia Lustosa Costa, Dra. Vânia Maria Maciel Melo, Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho e De. José Hélio Costa. A cópia do ato administrativo que nomeia os novos membros foi encaminhada a esta comissão.

A CTNBio esclarece que este extrato prévio não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A CTNBio informa que o público terá trinta dias para se manifestar sobre o presente pleito, a partir da data de sua publicação. Solicitações de maiores informações deverão ser encaminhadas, por escrito, à Secretaria Executiva da CTNBio.

EDIVALDO DOMINGUES VELINI

EXTRATO PRÉVIO Nº 4101/2014

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que encontra-se em análise na Comissão o processo a seguir discriminado:

Processo nº 01200.00241/1999-32
Requerente: Faculdade de Ciências Farmacéuticas - Unesp

Araraquara

CQB: 109/99
Pronot: 19912/2014

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

APÊNDICE A - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DO TRABALHO DE TESE

J Young Pharm, 2018; 10(2): 144-148

A multifaceted peer reviewed journal in the field of Pharmacy
www.jyoungpharm.org | www.phcog.net

Review Article

Chitinases as Antibacterial Proteins: A Systematic Review

Suelen Carneiro de Medeiros^{1*}, José Edvar Monteiro-Júnior², Gleilton Weyne Passos Sales¹, Thalles Barbosa Grangeiro² and Nádia Accioly Pinto Nogueira¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, BRAZIL.

²Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, BRAZIL.

ABSTRACT

Chitinases are hydrolases that catalyze the cleavage of the β -1,4-O-glycosidic linkages in chitin, a polysaccharide abundantly found in nature. Chitin is an important structural component of the cell wall of most fungi and the exoskeleton of arthropods, including insects and crustaceans. These enzymes are widespread in the living world, being found in organisms from all three domains of life. Due to their hydrolytic activity on chitin, chitinases have great biotechnological potential in different areas, such as human health, agriculture and food technology. The antifungal, insecticidal and nematocidal effects of many chitinases have been intensively investigated in the scientific literature, aiming to exploit these properties to protect crops against phytopathogenic fungi and insect pests and parasitic nematodes. On the other hand, the effects of chitinases on bacteria have been underexploited, possibly because chitin is not present in bacterial cell walls. The aim of this study was to search the scientific literature for works describing chitinases with antibacterial activity. Three bibliographic databases were searched using the keywords "chitinase" and "antibacterial" as descriptors and the chosen articles were selected according to specific

inclusion and exclusion criteria. As a result, we identified only 5 reports wherein 6 purified chitinases have been shown experimentally to have antibacterial activity. Three out of these 6 antibacterial chitinases were shown to be bifunctional enzymes, which have chitinase and lysozyme activity. The possible mechanism of action of these antibacterial chitinases is discussed, highlighting their potential as antibacterial agents.

Key words: Antimicrobial, Chitin, Lysozyme, Peptidoglycan, Hydrolases.

Correspondence

Suelen Carneiro de Medeiros, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, BRAZIL.

Phone: +55 85 3366826

Email: sumedeiros86@gmail.com

DOI: 10.5530/jyp.2018.10.33

INTRODUCTION

Chitin is a linear and water-insoluble polysaccharide constituted by *N*-acetyl- β -D-glucosamine (GlcNAc) units linked through β -1,4 linkages. This polymer is the most abundant amino polysaccharide in nature and after cellulose, is the second most plentiful biopolymer on earth. It is an important structural component of the cell wall of many fungi and the exoskeleton of arthropods, such as insects and crustaceans, like crabs, shrimps and lobsters. Chitin is also found in the shell and radula of mollusks and the cuticle and egg shell of nematodes.¹ Recently, Tang and co-workers have obtained evidences that chitin is endogenously produced in non-mammalian vertebrates, including fishes and amphibians.²

Chitinases (EC 3.2.1.14) are glycoside hydrolases (GHs) that catalyze the cleavage of the β -1,4 glycosidic bonds between the GlcNAc residues that form the chitin chains. Based on the similarities of their amino acid sequences, most chitinases are grouped into the GH18 and GH19 families according to the current classification of the Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy; <http://www.cazy.org>) database.^{3,4} Chitinases are found in a wide range of organisms including humans, seed plants, insects, bacteria and fungi. These enzymes are involved in a variety of biological processes, such as the remodeling of chitin in the cell walls of fungi and the exoskeleton of arthropods during the periods of growth and development,⁵ the utilization of chitin as a source of carbon and nitrogen by many bacteria⁶ and participation in defense mechanisms against pathogens.⁷ In plants, for example, besides being expressed in different tissues and organs during the regular growth and development, some chitinases act as pathogenesis-related proteins, whose expression is upregulated in response to chitin-containing pathogens. The hydrolytic action of these induced chitinases on the chitin fibers of the pathogen's

cell wall impairs its growth and spread, whereas the chitin oligomers released are recognized by plant chitin receptors, which trigger other defense reactions.⁸ In carnivorous plants, some chitinases also play a digestive role, being used along with other hydrolytic enzymes to digest caught prey in their pitchers.⁹

The great interest in the study of chitinases primarily relies on their enzymatic action on chitin. Endo-chitinases, for example, randomly cleave chitin chains at internal sites, producing low molecular mass chito-oligomers with 2 to 6 GlcNAc units, whereas exo-chitinases catalyze the progressive release of *N,N'*-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] or *N,N',N''*-triacetylchitotriose [(GlcNAc)₃] from the chitin chains.¹⁰ Some exo-type chitinases attack the chitin chains at the non-reducing end, but others cleave the polymer at the opposite end.¹¹ Due to their ability to degrade chitin, many chitinases can cause damages to the cell walls of fungi and cuticles of insects. The antifungal and insecticidal activities of these enzymes have attracted the attention of the biotechnologists, which has led to the development of transgenic crops with enhanced resistance to fungal pathogens and insect pests.¹² Chitinases with toxic effects towards plant-parasitic nematodes have also been investigated as an alternative strategy to protect crops from the serious damages these organisms cause in many parts of the world.¹³ The nematocidal effect of chitinases is also due to their degradative activity on chitin chains, which causes destruction of the nematode's cuticle, intestine and egg shell.¹⁴ Furthermore, it is also well documented that *N*-acetyl-chitooligosaccharides, which can be obtained from chitin by treatment with chitinases, have antibacterial, antifungal, metastasis suppression and other biological

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.