

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Clonagem e Expressão Heteróloga do Antígeno SsaA de *Staphylococcus saprophyticus* e Avaliação da Secreção Durante Interação com Macrófagos

ISABELLA INÊS RODRIGUES ROSA

GOIÂNIA-GO
(2016)

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Isabella Inês Rodrigues Rosa

Título do trabalho: Clonagem e Expressão Heteróloga do Antígeno SsaA de *Staphylococcus saprophyticus* e Avaliação da Secreção Durante Interação com Macrófagos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 13 / 09 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de

ISABELLA INÊS RODRIGUES ROSA

Clonagem e Expressão Heteróloga do Antígeno SsaA de *Staphylococcus saprophyticus* e Avaliação da Secreção Durante Interação com Macrófagos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dr.^a Juliana Alves Parente Rocha

GOIÂNIA-GO
(2016)

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Inês Rodrigues Rosa, Isabella

Clonagem e Expressão Heteróloga do Antígeno SsaA de *Staphylococcus saprophyticus* e Avaliação da Secreção Durante Interação com Macrófagos [manuscrito] / Isabella Inês Rodrigues Rosa. - 2016. XXXVIII, 38 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Alves Parente Rocha.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Staphylococcus saprophyticus*. 2. proteína secretada. 3. infecção. 4. fagocitose. 5. clonagem molecular. I. Alves Parente Rocha, Juliana, orient. II. Título.

CDU 577.2



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 037

Aos vinte e oito dias do mês de junho do ano de dois mil e dezesseis (28/06/2016), às nove horas, no Anfiteatro do ICB I/UFG, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Juliana Alves Parente Rocha, Prof. Dr. Juliano Domiraci Pაცez e Prof. Dr. Andre Correa Amaral** para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO ANTÍGENO SsaA DE *Staphylococcus saprophyticus* E AVALIAÇÃO DE SECREÇÃO DURANTE INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS"**, em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Isabella Inês Rodrigues Rosa**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 45 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

28 horas e 05 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu,
29 Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em Administração do Instituto
30 de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata
31 que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca
32 examinadora em três vias de igual teor.

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

Juliana A. P. Rocha

Profa. Dra. Juliana Alves Parente
Presidente da Banca
UFG/GO

Juliano Domiraci Paccez

Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez
UFG/GO

Andre Correa Amaral

Prof. Dr. Andre Correa Amaral
UFG/GO

Nada mais justo que eu dedicar esse trabalho aquele que me colocou onde estou agora, que me amparou todas as vezes que eu pensei em desistir, me socorreu sempre que precisei, e permitiu que eu aprendesse tanto sobre ciência, mas principalmente sobre a vida. Eu dedico essa dissertação a Deus, sem Ele, eu jamais teria conseguido. E então eu dedico aos meus pais Inez e Waldir, e meus irmãos Sarah e Daniel por todo o apoio, amor e paciência que recebi para que pudesse completar mais essa etapa.

“Toda grande caminhada começa com um simples passo.”

Buda

AGRADECIMENTOS

É difícil expressar em palavras tudo o que tenho a agradecer pela oportunidade que tive de aprender, crescer e lutar, mas eu inicio meus agradecimentos àquele que tornou isso possível e sempre esteve ao meu lado, para sorrir comigo ou me amparar quando eu precisei, e esses momentos, foram mais frequentes. Hoje eu sei que de tanto a gente pedir, uma hora a gente aprende mesmo a confiar, mas foram dois anos pedindo para eu realmente entender, que em todos os momentos, Deus esteve ao meu lado. Parece estranho pensar isso quando vem à mente todos os momentos, tudo o que aconteceu, tudo o que vivi, e todas as vezes que quis desistir, mas sim, Ele estava lá, esperando que eu confiasse, observando eu me tornar quem Ele quer que eu seja, querendo que eu aprendesse. Eu agradeço a Deus, por todas as lágrimas, por todos os sorrisos, por cada um dos experimentos que repetidamente dava errado, e também por quando finalmente deu certo. Agradeço principalmente por todos os momentos em que eu pensei que eu não dava conta mais, que eu não nasci pra isso, que eu estava no lugar errado, na carreira errada e todas as vezes que quis desistir. E eu agradeço, porque hoje eu sei que eu cheguei até aqui, e só Deus sabe mesmo o quanto foi difícil, e hoje eu sei que eu posso, eu consigo chegar onde eu quiser e precisar chegar, hoje eu sei lutar, resistir, persistir, confiar. Eu achei que tinha chegado ao limite, mas eu agradeço a Deus por ter me mostrado, que não existe limite.

Em segundo lugar eu quero agradecer à meu exemplo de profissional e de pessoa, a minha orientadora professora Juliana, ou simplesmente Ju. Agradeço por ter me acolhido de braços abertos e ser sempre tão acessível e disponível, sendo exatamente minha mãe científica. Agradeço pelas vezes em que praticamente teve que desenhar para eu entender, e também pelas vezes que realmente desenhou, ou quando deixou que eu descobrisse sozinha, mesmo já sabendo a resposta. Eu agradeço por toda paciência e calma que me passou durante esse tempo, sempre dizendo “Calma, não é a hora de desesperar”, e eu não entendia, quando é a hora? Bom, nunca era a hora porque nunca é hora de desesperar. Agradeço por não ter me ensinado, mas me guiado e assim ser o exemplo de profissional que eu quero ser.

Agradeço aos meus pais Waldir e Inez, que me apoiaram durante toda a vida e especialmente durante esse tempo. Agradeço por terem me deixado livre para tomar minha decisão, mas sempre acreditando que eu era capaz. Agradeço pela paciência que tiveram comigo quando eu chegava tão frustrada e eu mesma não tinha paciência. Agradeço por cuidarem de mim em cada um dos momentos que passei, principalmente nos ruins. Agradeço a meus irmãos Sarah e Daniel por se preocuparem comigo e se orgulharem, mesmo quando não faziam ideia do que eu falava.

Agradeço às pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer no LBM: Bianca, Guilherme, Rosi, Janaína, Aparecido, Lana, Leandro, Karla, Laura, Livia e tantos outros que peço que me perdoem por não citar os nomes, mas quero vocês para a vida toda! Vocês tornaram meus dias mais fáceis e alegres, obrigada por tudo!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	x
TABELAS E FIGURAS	xi
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O gênero <i>Staphylococcus</i>	1
1.1.1. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2
1.2 Fatores de virulência.....	3
1.2.1 Fatores de virulência de superfície	3
1.2.2 Fatores de virulência secretados	5
1.2.2.1 Antígeno Estafilocócico Secretado A (SsaA).....	7
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Cultivo de <i>S. saprophyticus</i> e extração de DNA genômico.....	12
4.2 Desenho de oligonucleotídeos	12
4.3 Amplificação do gene codificante para SsaA por reação de PCR e purificação da reação	13
4.4 Clonagem em vetor de expressão e transformação em bactérias <i>E. coli</i>	14
4.5 Expressão heteróloga em sistema bacteriano.....	14
4.6 Produção de anticorpos recombinantes.....	15
4.7 Análise de anticorpos recombinantes por Western Blot	15
4.8 Infecção experimental de macrófagos	16
4.8.1 Análise da interação de SsaA com proteínas de macrófagos	17
4.8.2 Ensaio de imunofluorescência	17
5. RESULTADOS	19
5.1 Construção do plasmídeo recombinante	19
5.2 Expressão de SsaA.....	21
5.3 Produção de anticorpos policlonais	22
5.4 Análise da sobrevivência de <i>S. saprophyticus</i> após fagocitose	23
5.5 Comportamento de SsaA após fagocitose	23
6. DISCUSSÃO	27
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Mapa do vetor Plasmidial recombinante pGEX-4T3 *ssaA*. A. Inserção de *ssaA* no vetor pGEX-4T3 a partir de oligonucleotídeos contendo 10pb e 16pb do vetor de clonagem na porção 5' sentido e antisentido, respectivamente, e sítio de restrição para *EcoRI*. B. O vetor recombinante apresenta marca de seleção por resistência a ampicilina (Amp^R), origem de replicação (*ori*), óperon *lacI* e seu promotor, promotor *taqI*, proteína Glutathiona-S-Transferase (GST) à qual a SsaA foi fusionada e códon de parada

Figura 2. Confirmação da transformação de células de *E. coli* com o plasmídeo recombinante em gel de agarose. 1. Vetor circular utilizado para clonagem pGEX-4T3. 2. Plasmídeo recombinante da colônia *ssaA*+ após digestão com enzima de restrição *EcoRI*, liberando um fragmento referente ao vetor e um referente à *ssaA* (seta pequena) 3. Amplificação do gene *ssaA* (seta grande) da colônia selecionada (*ssaA*+) correspondente ao tamanho de 726pb . 4. Controle negativo da reação de amplificação de *ssaA*. 5. Vetor plasmidial da colônia transformada sem inserção de *ssaA*, após digestão com enzima de restrição *EcoRI*.

Figura 3. Otimização da expressão de SsaA recombinante em gel unidimensional SDS-page quanto a tempo de incubação com IPTG. 0. Tempo anterior à adição de IPTG. 30'. 30 minutos após a adição de 0,5mM IPTG é possível observar a produção de GST pela colônia controle. 1. Após 1 hora nota-se a presença de SsaA fusionada à GST (aprox.. 51kDA) pela colônia *ssaA*+. 2. Após 2 horas há maior produção de SsaA.

Figura 4. Western Blot com soro contendo anticorpos recombinantes anti-SsaA. Soro 1, Soro 2 e Soro 3 representam o soro de 3 camundongos isogênicos testados em concentrações de 1:1000, 1:750 e 1:500.

Figura 5. Gráfico da média de unidades formadoras de colônias (CFU) de *S. saprophyticus* recuperadas após fagocitose por macrófagos. Após 30 minutos de incubação a média de duplicata experimental e biológica é de $1075 \cdot 10^5$ CFU/mL com desvio padrão de $\pm 170,78$ CFU/mL, e após 1 hora de incubação a média é de $400 \cdot 10^5$ CFU/mL e desvio padrão $\pm 81,65$ CFU/mL.

Figura 6. Análise da interação entre SsaA e proteínas de macrófagos o comportamento de SsaA durante infecção de macrófagos. A. Western Blot com proteínas de macrófagos infectados com *S. saprophyticus* (1), proteínas de macrófagos não infectados como controle negativo (2), e proteínas secretadas de *S. saprophyticus* como controle positivo (3) e incubadas com anticorpo anti-SsaA.

Figura 7. Imunofluorescência durante infecção de macrófagos com *S. saprophyticus* incubados com anti-SsaA. Leitura em campo claro apresentando células de macrófagos intactas e leitura da fluorescência originada pela interação entre SsaA e de anticorpos anti-SsaA marcados com FITC. Macrófagos infectados com *S.*

saprophyticus apresentam fluorescência referente à SsaA secretada em seu interior e predominantemente dispersa pelo citoplasma (seta grande), e em menor quantidade limitada ao fagossomo (seta pequena). Controle realizado com células de macrófagos não infectados não revelam fluorescência significativa.

Tabela 1. Descrição de oligonucleotídeos utilizados, sequência gênica *ssaA* e proteína SsaA.

SIGLAS E ABREVIATURAS

Aas – Autolisina de *S. saprophyticus*;

agr – Gene Regulador Acessório;

AmpR – Marca de seleção por resistência à ampicilina;

ATCC – *American Type Culture Collection*;

AtlC – Autolisina de *S. caprae*;

AtlE- Autolisina de *S. epidermidis*;

BCIP – *5-bromo-4-cloro-3-indolyphosphate*;

BL21 (DE3) pLysS – Linhagem de *Escherichia coli*;

BLAST – *Base Local Alignment Search Tool*;

BSA – *Bovine Serum Albumin*;

CFU – Unidade Formadora de Colônia;

C-terminal – Carboxi-terminal;

EcoRI - *Escherichia coli* RI. Enzima de restrição

FAME – *Fatty acid modifying enzyme* (Enzima de Modificação de Lipídeos);

Fc de imunoglobulinas – *Fragment Crystalline*;

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína;

GST – Glutathione-S-Transferase;

HslU - *Heat shock locus U* (Locus de Choque Térmico U);

IFN- γ – Interferon gama;

IgG – Imunoglobulinas G;

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo;

IsaA – Immunodominant Staphylococcal Antigen A (Antígeno Imunodominante A);

IsaB - Immunodominant Staphylococcal Antigen B (Antígeno Imunodominante B);

IsdB - *Iron-Regulated Surface Determinant Protein B* (Proteína Determinante de Superfície Regulada por Ferro);

kbp – Quilo Pares de Bases;

LysM - *Lysin Motif*;

M2 – Classe de Macrófagos;

MEM - *Minimal Essential Medium* (Meio Mínimo Essencial);

mix – Mistura;

MLSa - Macrolídeo-Lincosamida-Estreptogramina B

MRSA – *Meticilin Resistent Staphylococcus aureus* (*S. aureus* Resistente à Meticilina);

NBT – *Nitroblue Tetrazolium*;

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*;

OD₆₂₀ – Densidade Ótica em 620nm;

operon ftsAZ - Filamenting Temperature-Sensitive Mutant A-Z. Genes responsáveis por divisão celular;

operon lacI – Óperon ativo na presença de lactose;

ORFs – Open Reading Frames (Matriz de leitura aberta);

pbs – Pares de bases;

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase;

pGEX-4T3 – Vetor de Clonagem Comercial;

pGEX-4T3 *ssaA* – Vetor Plasmidial com Inserção de *ssaA*;

pSSP1 e pSSP2 – Plasmídeos de *S. saprophyticus*;

G – Força G;

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*. Meio de Cultura;

SarA - *Staphylococcal Accessory Regulator A*;

SCN - *Staphylococcus* Coagulase Negativa;

SCP – *Staphylococcus* Coagulase Positiva;

SdrI - *Serine-aspartate repeat-containing protein I*;

SDS-PAGE - Sódio Dodecil Sulfato – Eletroforese em Gel de Poliacrilamina;

SigB – Fator sigma B;

Slf70 - *Soluble lytic transglycosylase 70* (Transglicosilase lítica solúvel 70)

SsaA – *Staphylococcal secretory antigen A* (Antígeno Secretado Estafilocócico A);

ssaA+ - Colônia Transformada com vetor plasmidial recombinante contendo *ssaA*;

Ssp – *Staphylococcus saprophyticus surface-associated protein* (Proteína associada à superfície de *S. saprophyticus*);

SssF - *Staphylococcus saprophyticus surface protein F* (Proteína de Superfície de *S. saprophyticus* F);

TCS - Two-Component Regulatory System (Sistema Regulatório de Dois Components);

Tris – Tris-Hidroximetil-Aminometano;

TSS – Síndrome do Choque Tóxico;

UafA – Uroadherence factor A (Fator de uro-aderência A);

UafB – Uroadherence factor B (Fator de uro-aderência B);

VRSA – Vancomycin Resistent *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* Resistente à Vancomicina);

YycG/YycF - Sistema regulatório de dois componentes composto por uma histidina quinase (YycG) e um regulador transcricional (YycF);

RESUMO

Staphylococcus saprophyticus é uma bactéria patogênica do trato urinário e principal agente etiológico de infecções urinárias por bactérias Gram-positivas. Apesar de potencialmente *S. saprophyticus* ocasionar infecções graves como pielonefrite, septicemia, nefrolitíase e endocardite, e relatos de multirresistência a antibióticos, relativamente pouco é conhecido sobre os mecanismos utilizados por esta bactéria durante infecção. Proteínas secretadas podem ser essenciais nesses mecanismos se seus papéis forem durante fagocitose auxiliando uma internalização ativa na célula fagocítica, protegendo contra o estresse oxidativo e aumentando a persistência de células bacterianas no interior de fagócitos, e/ou causando lise da célula hospedeira. Recentemente nosso grupo identificou a proteína imunogênica SsaA no secretoma de *S. saprophyticus*. Essa proteína já havia sido identificada em *S. aureus* como altamente imunogênica, e parece estar relacionada a fatores de virulência como o Antígeno Imunodominante A (IsaA), a proteína Urease, a hidrolase de peptidoglicano LytM, a Proteína Repressora de Toxinas (Rot) e a proteína de choque térmico HslU. Contudo, poucos estudos conseguem identificar a proteína SsaA secretada e nenhum analisa sua contribuição durante infecção por bactérias do gênero *Staphylococcus*. Através da construção de um vetor de clonagem contendo o gene *ssaA* de *S. saprophyticus*, expressão heteróloga da proteína recombinante e produção de anticorpos policlonais específicos, foi possível verificar a interação entre SsaA e proteínas de macrófagos infectados por células de *S. saprophyticus*. Através de microscopia de imunofluorescência, foi verificado que a secreção de SsaA não é limitada à fagossomos, mas esta proteína é dispersa em todo o citoplasma da célula fagocítica após internalização de células bacterianas. Os resultados encontrados sugerem que SsaA é utilizada por *S. saprophyticus* durante infecção, especificamente durante fagocitose. Estudos posteriores serão necessários para confirmar se SsaA possui atividade lítica e caracteriza-la como fator de virulência, contribuindo para elucidar estratégias utilizadas por *S. saprophyticus* durante infecção no hospedeiro humano.

Palavras-chave: *Staphylococcus saprophyticus*, proteína secretada, infecção, fagocitose.
Apoio financeiro: CAPES, CNPq, FAPEG.

ABSTRACT

Staphylococcus saprophyticus is a pathogenic bacterium of the urinary tract and the main etiological agent of urinary tract infections by Gram-positive bacteria. Although *S. saprophyticus* potentially can cause serious infections such as pyelonephritis, septicemia, endocarditis and nephrolithiasis, and also multidrug resistance has been reported, not much is known about the mechanisms used by this bacterium during infection. Secreted proteins might be essential on those mechanisms if their role is accomplished during phagocytosis by their assistance of an active infection in phagocytic cells, protecting against oxidative stress and increasing the persistence of bacterial cells within phagocytes, and / or causing lysis of the host cell. Recently our group identified the immunogenic protein SsaA in the secretome of *S. saprophyticus*. This protein had been previously identified in *S. aureus* proteome, and it appears to be controlled by regulatory systems for known virulence factors. It also presents similarities with lytic proteins and proteins that assist the persistence within phagocytic cells. However, no approach had analyzed the contribution of SsaA during infection, therefore, through the construction a cloning vector containing the *S. saprophyticus* gene *ssaA*, heterologous expression of the recombinant protein and the production of specific polyclonal antibodies, it was able to verify the interaction of SsaA and proteins from macrophages infected by bacterial cells. Through immunofluorescence microscopy, it was verified that the dispersion of SsaA is not limited to phagocytic cells but it was throughout their cytoplasm after internalization of the bacterium. These findings together with other evidence in the literature suggest that SsaA is used during infection by *S. saprophyticus*, more specifically during phagocytosis. Further approaches are required to confirm if SsaA has a lytic activity and also characterize this protein as a virulence factor, contributing to elucidate strategies used by *S. saprophyticus* during infection in the human host.

Key Words: *Staphylococcus saprophyticus*, secreted protein, infection, phagocytosis.

Financial support: CAPES, CNPq, FAPEG.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Staphylococcus*

As mais diversas e elegantes estratégias utilizadas por bactérias para evasão do sistema imune, que visam à sobrevivência e disseminação, têm sido descritas para bactérias do gênero *Staphylococcus*. As bactérias desse gênero se caracterizam como Gram-positivas com atividade coagulase positiva (SCP) como *Staphylococcus aureus*, ou coagulase negativa (SCN) como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* (NICOLLE et al., 1983)

Comumente, as bactérias do gênero *Staphylococcus* são encontradas na microbiota humana, colonizando tecidos como epiderme, trato respiratório superior, gastrointestinal e urinário (NICOLLE et al., 1983). Contudo, algumas podem causar patologia e sintomatologia particulares a cada espécie, mas comumente apresentam mecanismos similares para manutenção da infecção.

Devido à gravidade de sua infecção e alta capacidade de adquirir resistência a antibióticos, *Staphylococcus aureus* é o representante em maior evidência no gênero. Essa bactéria é causa principal de infecções respiratórias, de pele, tecidos moles, ossos, doenças endovasculares e intravasculares como bacteremia e septicemia, principalmente de origens hospitalares. (EMORI et al., 1993).

S. aureus apresenta alta capacidade de resistência a antibióticos, sendo a cepa resistente à meticilina MRSA (*Meticilin Resistent Staphylococcus aureus*) responsável por altos índices de mortalidade e morbidade hospitalar (PANLILIO et al., 1992). Em adição, o contínuo aparecimento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) tem sido relatado e temido, pois este é utilizado como estratégia para tratar infecções por MRSA (SMITH et al., 1999).

Megyeri et al., 2002 verificaram uma alta expressão de citosinas pró-inflamatórias e receptores de antígenos em macrófagos mononucleares causada por diferentes bactérias do gênero *Staphylococcus*, estabelecendo *S. aureus* como maior indutor da expressão em comparação à *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*. Isto foi observado mesmo com células inativadas, demonstrando que apenas os componentes

proteicos da célula bacteriana atuam na exacerbação da resposta imune, processo característico à patogênese por *S. aureus*.

1.1.1. *Staphylococcus saprophyticus*

O grupo de bactérias patogênicas do gênero *Staphylococcus* que não possuem capacidade de produção de coagulase é composto por *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (NICOLE et al., 1983).

S. saprophyticus está envolvido em infecções do trato urinário, sendo o principal agente etiológico de infecções urinárias por bactérias Gram-positivas principalmente em mulheres jovens (RAZ et al., 2005). Essa bactéria, juntamente com *Escherichia coli* totalizam cerca de 90% das infecções urinárias agudas em mulheres (GUPTA et al., 1999)

A infecção por *S. saprophyticus* pode ainda acarretar agravamentos como pielonefrite, septicemia, nefrolitíase e endocardite (HEDMAN e RINGERTZ, 1991; GLIMAKER et al., 1988; SINGH e RAAD, 1990).

O aparecimento de cepas de *S. saprophyticus* resistentes a meticilina assim como a cepa MRSA de *S. aureus*, tem sido constantemente reportado (HIGASHIDE et al., 2008; MALYSZKO et al., 2014).

Foi verificado também que *S. saprophyticus*, possui a capacidade de invasão de células eternizadas de bexiga 5637 não fagocíticas (SZABADOS et al., 2008), assim como relatado para *Escherichia coli*, bactéria gram-negativa também responsável por infecções urinárias. (MARTINEZ et al., 2000).

Com o sequenciamento do genoma de *S. saprophyticus* foram encontradas algumas semelhanças entre esta, *S. aureus* e *S. epidermidis*, como a existência de 582 (23,8%) ORFs específicas de *S. saprophyticus* em *S. aureus* e *S. epidermidis* e dois plasmídeos (pSSP1 e pSSP2) comuns às três bactérias. Contudo, evidenciando a especificidade de sua patogênese, *S. saprophyticus* apresenta os mais diversos sistemas de transporte de íons componentes da urina (KURODA et al., 2005).

Diversos genes codificantes de proteínas ancoradas à parede celular foram encontrados em *S. saprophyticus* (COMFORT e CLUBB, 2004). Dentre elas o fator de

uroaderência A (UafA) e B (UafB) são particularmente importantes para a infecção por essa bactéria por apresentarem capacidade de hemaglutinação, facilitando a aderência dessa bactéria ao epitélio do sistema urinário (KURODA et al., 2001).

Apesar das demais bactérias do gênero possuírem diversos mecanismos que garantem sobrevivência e tolerância ao estresse osmótico, *S. saprophyticus* apresenta em seu genoma mais sistemas de proteção à mudança de pH, concentração de ureia, íons inorgânicos e sistemas de transporte de moléculas protetoras da osmolaridade que os demais integrantes do gênero, novamente confirmando a especificidade na patogênese por essa bactéria (KURODA et al., 2005).

1.2 Fatores de virulência

Diversas moléculas de superfície e secretadas por bactérias são indispensáveis para o sucesso no processo infectivo. Essas moléculas podem constituir a superfície celular bacteriana, sendo responsáveis por estruturas de proteção, sistemas de secreção e transporte e proteínas de aderência e interação, e/ou serem secretadas e atuarem na captação de nutrientes, sobrevivência à fagocitose e lise de células do hospedeiro (LEE e SCHNEEWIND, 2001).

1.2.1 Fatores de virulência de superfície

Uma estrutura bem elucidada é formada pela proteína A, comumente encontrada na superfície de *S. aureus* responsável pela proteção contra opsonização por sua capacidade em se ligar a porção Fc de imunoglobulinas. (CEDERGREN et al., 1993; KIM et al., 2012). Mutantes para essa proteína apresentaram menor virulência durante a infecção de camundongos e maior taxa de fagocitose (GEMMELL et al., 1991; PALMQVIST et al., 2002).

A formação de biofilme é uma característica comum às bactérias do gênero (RAAD, I. et al., 1998) e pode influenciar a ação do processo imune, dificultando a fagocitose por opsonização pela obstrução da ação de proteínas intermediárias do sistema complemento (KO et al., 2013) e/ou facilitar a adesão e infecção ativa de células do hospedeiro.

A capacidade de formação de biofilme pode ainda alterar a diferenciação de macrófagos para o tipo M2, uma classe imunomoduladora que apresenta baixa atividade

bactericida (STRAUSS-AYALI et al., 2007; THURLOW, L. R. et al., 2011), e ainda parece favorecer a persistência de bactérias no interior de macrófagos (BOELENS et al., 2000).

Algumas proteínas autolisinas como Aas em *S. saprophyticus*, AtlE em *S. epidermidis* e AtlC em *S. caprae* são importantes durante a formação de biofilme através da capacidade de remodelamento de peptidoglicano (HEILMANN et al., 1996; ALLIGNET et al., 2001; KNOBLOCH et al., 2001). Proteínas de superfície e ácido teitóico ligantes às proteínas de matriz celular como fibronectina, fibrinogênio e albumina ou de superfícies de células do hospedeiro também influenciam no processo de formação de biofilme (SINHA et al., 2000; GROSS et al., 2001; KO et al., 2013).

Foi verificado que a composição de ácidos teitóicos de *S. saprophyticus*, auxilia a aderência dessa bactéria à células epiteliais do trato urinário (TETI et al., 1987) e garantem proteção à morte por ácidos graxos livres (KOHLENER et al., 2009), muitas vezes por modificar ácidos graxos tóxicos em diacil-glicerol (CHARMBERLAIN e BRUEGGEMANN, 1997).

Algumas proteínas ligantes de componentes da matriz celular encontradas em *S. saprophyticus* também possuem características autolíticas, como a proteína ligante de colágeno SdrI, a proteína Aaa, os fatores de uroaderência UafA e UafB. Essas proteínas possuem afinidade à fibronectina, se tornando capazes de causar hemaglutinação e fundamentais na aderência durante infecção do trato urinário (HELL et al., 1998; GATERMANN e MEYER, 1994; MEYER et al., 1996; HELL et al., 2003; KURODA et al., 2005; SAKINÇ et al., 2006; SAKINÇ et al., 2009; KING et al., 2011; KING et al., 2012).

Outras proteínas de superfície auxiliam a aderência de *S. aureus* à superfície de células fagocíticas não especializadas, facilitando a internalização ativa dessa bactéria na célula hospedeira. Algumas dessas proteínas ainda atuam na formação do biofilme (SINHA et al., 2000, GEOGHEGAN et al., 2013).

Estudos recentes de uma proteína de superfície regulada por ferro B (IsdB) em *S. aureus* demonstraram sua atuação como proteína de adesão facilitadora da internalização de *S. aureus* em células não-fagocíticas (ZAPOTOCZNA et al., 2013).

S. saprophyticus possui algumas proteínas de superfície que atuam na sobrevivência à fagocitose, como a lipase Ssp que garante maior proteção frente aos ácidos graxos livres (SAKINÇ et al., 2009; SZABADOS et al., 2013) e a proteína SssF específica ao ácido linoleico (KING et al., 2012).

Em 2013, KORTE-BERWANGER et al. associaram a regulação positiva da proteína Ssp de *S. saprophyticus* à presença D-serina, um aminoácido potencialmente tóxico para bactérias e encontrado em grandes quantidades na urina. Identificaram também um novo fator de virulência para *S. saprophyticus*, a proteína D-serina-Desaminase que converte D-serina em piruvato e amônia.

1.2.2 Fatores de virulência secretados

Diversas estratégias que garantem sobrevivência e proliferação podem ser compreendidas durante a análise de proteínas secretadas, muitas das quais proteínas, durante a patogênese, podem causar respostas imunológicas exacerbadas como observado em toxinas, mas são utilizadas por causarem danos às células de defesa ou garantirem a sobrevivência do micro-organismo durante no interior de células fagocíticas, impedindo o estresse oxidativo (LEE e SCHNEEWIND, 2001).

Os primeiros relatos da importância clínica de proteínas secretadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* foram feitos por Dack et al., 1930, e Jordan et al., 1930 após observação que o sobrenadante filtrado de uma cultura de bactérias deste gênero induzia sintomas de intoxicação alimentar.

Posteriormente, a síndrome do choque tóxico (TSS), similar a sepse, foi associada a uma proteína secretada predominantemente por *S. aureus* (SCHLIEVERT et al., 1981). As toxinas TSSTs e enterotoxinas foram classificadas como superantígenos, por induzirem a produção aumentada de anticorpos e citosinas com consequente ativação de células T (LINA et al., 2004).

Contudo, infecções graves por bactérias do gênero *Staphylococcus*, as quais podem apresentar exacerbação da resposta imune gerada por proteínas secretadas, podem transitar entre uma colonização silenciosa ou infecção crônica (TUCHSCHERR et al., 2011). Esse processo depende em parte, da regulação que proteínas extracelulares sofrem por alguns sistemas regulatórios como *agr*, *SarA* e *sigB*. Esses sistemas

garantem direta ou indiretamente que diversas proteínas sejam produzidas e secretadas após a fase de crescimento exponencial (RECSEI et al., 1986).

TSST-1, alguns superantígenos e outras proteínas secretadas são regulados pelo sistema *quorum-sensing* no locus *agr* (gene regulatório acessório). Esse sistema atua na mudança do padrão de proliferação de células bacterianas por diminuir a produção de proteínas de superfície que promovem adesão e aumentar a produção de proteínas extracelulares que facilitam a disseminação (RECSEI et al., 1986, NOVICK e MUIR, 1999). Construções de mutantes para *agr* demonstram sua influência também na formação de biofilme (VUONG et al., 2000).

Construções de mutantes para o componente *rsbU* do locus regulatório *sigB*, resultaram em aumento na expressão de proteínas de superfície e diminuição da expressão de dois fatores de virulência secretados, uma lipase e uma protease, em *S. epidermidis*. Foi verificado também que *sigB* apresenta influência na formação de biofilme pela diminuição da produção de polissacarídeos importantes para a adesão de células a superfícies (KNOBLOCH et al., 2001). Jonsson et al, 2004 verificaram que cepas contendo RsbU ativo apresentaram maior severidade e persistência em rins do que aquelas que não continham RsbU.

Algumas proteases e lipases, como a enzima estafilocócica de modificação de ácidos graxos (FAME) juntamente com lipases de membrana, são secretadas e podem degradar componentes de membranas, garantir sobrevivência a moléculas tóxicas do hospedeiro e inativar antibióticos (KAPRAL et al., 1992).

Existem ainda, proteínas secretadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, que apresentam papéis citolíticos por atuarem na formação de poros em membranas citoplasmáticas de eritrócitos e/ou leucócitos (MCKEVITT et. al., 1990; SPAAN et al., 2014). Recentemente, uma proteína secretada de *S. aureus* nomeada ϵ -citotoxina, foi associada à lise de queratinócitos durante infecções de pele, podendo atuar na invasão tecidual e diminuição da reintegração epitelial (MERRIMAN et al., 2015).

Burlak et al., 2007 verificaram um aumento na produção e secreção de proteínas Aur, Hla, SspA e SspB durante persistência de *S. aureus* no interior de vacúolos fagocíticos. Após 3 a 4 horas de internalização, essas proteínas se encontravam

dispersas por todo o citosol da célula hospedeira, e foram associadas a processos líticos de células fagocíticas.

Poucos mecanismos utilizados por *S. saprophyticus* são conhecidos e elucidados, dentre eles, apenas uma proteína secretada é associada à infecção por essa bactéria, a proteína Urease. Essa proteína é uma das principais estratégias utilizadas por *S. saprophyticus* devido à capacidade de converter ureia em amônia e dióxido de carbono, resultando no aumento do pH da urina e facilitando a sobrevivência no trato urinário (GATERMANN e MARRE, 1989).

1.2.2.1 Antígeno Estafilocócico Secretado A (SsaA)

A importância de proteínas secretadas na patogênese por bactérias do gênero *Staphylococcus* é evidenciada em inúmeros estudos direcionados a estas proteínas que permitem sua identificação e caracterização de seus diferentes papéis durante infecção.

Contudo, poucos estudos com ênfase no exoproteoma ou com abordagens de imunoproteômica, conseguiram identificar uma proteína secretada conservada no gênero, denominada Antígeno Secretado Estafilocócico A (SsaA) em *S. aureus* e *S. epidermidis*, mas nenhum conseguiu determinar função ou associar a presença desse antígeno a mecanismos de virulência em quaisquer espécies (LANG et al., 2000; CORDWELL et al., 2002; MARTIN et al., 2002; DUBRAC e MSADEK, 2004 ; STAPLETON et al, 2007)

Inicialmente, Lang et al., 2000 buscaram identificar proteínas secretadas por *S. epidermidis* com atividades antigênicas que poderiam ter papel significativo no estabelecimento de infecção severa por este micro-organismo. Pela análise do soro de pacientes e do exoproteoma, conseguiram identificar SsaA, que se apresentou como altamente imunogênico e secretado quase exclusivamente durante sepse e endocardite severas.

Lorenz et al., 2000 na tentativa de encontrar novos alvos para o desenvolvimento de antibióticos, isolou duas proteínas com grande potencial de atuação na virulência de cepas MRSA. Essas proteínas foram identificadas após a observação de

altos níveis de anticorpos específicos a elas em pacientes infectados com esta cepa, nomeada como Antígeno Imunodominante Estafilocócico A (IsaA) e B (IsaB).

Um estudo proteômico avaliou a resistência da cepa MRSA à Triton X-100, um detergente previamente demonstrado por reduzir a resistência à meticilina. Foi identificado um aumento da produção de SsaA juntamente com a enzima Urease, proteína de choque térmico HslU, duas variantes do locus regulatório SarA e o Antígeno Imunodominante Estafilocócico IsaA. Também foi possível identificar a diminuição de uma proteína repressora de toxinas Rot (CORDWELL et al., 2002).

Através de uma análise comparativa da sequência de IsaA com a base de dados de domínios conservados, Sakata et al., 2005 verificaram a similaridade com domínio catalítico C-terminal da transglicosilase lítica solúvel de *E. coli* (Slt70) conhecida e a conservação do resíduo glutamato, responsável pela catálise. Também foi determinada, por microscopia eletrônica utilizando imunoglobulinas G marcadas, a localização principal dessa enzima nos septos de células em divisão, associando a provável função de IsaA na divisão celular.

É conhecido que sistemas regulatórios de transdução de sinal de dois componentes (TCSs) regulam a expressão de genes relacionados à virulência (DZIEJMAN e MEKALANOS, 1995), e que um TCS composto por uma histidina quinase YycG e um regulador de resposta YycF se mostrou essencial em *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae* (FABRET et al., 1998; LANGE et al., 1999; THROUP et al., 2000; WAGNER et al., 2002).

O sistema regulatório YycG/YycF também está envolvido na regulação do operon *ftsAZ* responsável pela divisão celular em *Bacillus subtilis* (FUKUCHI et al., 2000). Mutações nesses sistemas em *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* foram letais (MARTIN et al., 1999; FERDELE et al., 1999; KALLIPOLITIS et al., 2001).

Em *S. aureus* o sistema YycG/YycF parece atuar na permeabilidade de membrana, e um mutante para *yycF* apresentou virulência atenuada *in vitro* e *in vivo* (MARTIN et al., 1999), bem como esse sistema parece atuar na produção do antígeno secretado SsaA, e na resistência a antibióticos macrolidolincosamida-streptogramina B (MLSa) (MARTIN et al., 2002).

Dubrac e Msadek, 2004 verificaram que os antígenos SsaA e IsaA, e uma hidrolase de peptidoglicano LytM de *S. aureus* são controlados pelo sistema YycG/YycF por ligação direta à região promotora dos respectivos genes. Posteriormente, em 2007, Sakata et al, detectaram maiores níveis de IsaA durante a fase de crescimento exponencial demonstrando o envolvimento desta na proliferação bacteriana.

Stapleton et al, 2007 através da construção de mutantes verificaram que a diminuição na expressão de *isaA* resultou no aumento de SsaA revelando que esse antígeno secretado possa ser regulado tanto pelo sistema YycG/YycF quanto por IsaA. Testes de divisão celular e ensaio de infecção de camundongos revelaram que o mutante para *isaA* teve grande índice de agrupamento celular e divisão celular incorreta e virulência atenuada. Possivelmente, enquanto IsaA parece atuar na divisão celular durante a fase exponencial, SsaA seria essencial em fases posteriores.

Através de experimentos de imunoproteômica nosso grupo identificou proteínas secretadas e de superfície de *S. saprophyticus* que possam atuar na interação desta bactéria com hospedeiro já que relativamente pouco é compreendido acerca de mecanismos de patogênese e sobrevivência durante a colonização por este microrganismo no trato urinário.

Dentre essas proteínas, o antígeno SsaA foi, pela primeira vez, identificado em *S. saprophyticus*, e se apresentou como imunogênico em contato com soro contendo anticorpos policlonais obtidos de camundongos imunizados com o secretoma desta bactéria. (OLIVEIRA et al., manuscrito submetido).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do envolvimento de *S. saprophyticus* em complicações de infecções do trato urinário, e o relato de cepas resistentes a meticilina (HIGASHIDE et al., 2008; MALYSZKO et al., 2014), pouco é conhecido acerca dos mecanismos utilizados por essa bactéria para o seu estabelecimento e sucesso no processo infectivo.

Alguns dos mecanismos conhecidos contam com proteínas de superfície como a lipase Ssp, proteína SssF (SZABADOS et al., 2013; KING et al., 2012; KORTE-BERWANGER et al., 2013), os fatores de uroaderência A (UafA) e B (UafB) e a autolisina Aaa (GATERMANN et al., 2001; KURODA et al., 2001). Contudo, apenas uma proteína secretada é conhecidamente um fator de virulência importante para *S. saprophyticus*, a proteína urease (GATERMANN e MARRE, 1989).

A proteína SsaA foi identificada em *S. aureus* e *S. epidermidis* como antígeno imunogênico, e é uma proteína regulada por sistemas que também regulam fatores de virulência conhecidos de *S. aureus*. Nosso grupo conseguiu identificar SsaA como proteína imunogênica também no secretoma de *S. saprophyticus*, o que instigou a necessidade de estabelecer ou indicar seu papel durante infecção e contribuir para a elucidação dos mecanismos utilizados por *S. saprophyticus* durante o processo infectivo, que até então permanecem obscuros.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o papel da proteína SsaA durante a infecção *in vitro* de macrófagos por *S. saprophyticus*. Em função desse objetivo geral tivemos as seguintes metas:

- Desenho e síntese de oligonucleotídeos para o gene codificante do antígeno secretado estafilococcíco SsaA;
- Amplificação do gene *ssaA* por PCR;
- Clonagem de *ssaA* em vetor de expressão heteróloga pGEX-4T3;
- Produção da proteína SsaA recombinante em sistema heterólogo bacteriano de *Escherichia coli*;
- Obtenção de anticorpos policlonais específicos em camundongos;
- Avaliação da secreção de SsaA por *S. saprophyticus* durante interação com macrófagos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *S. saprophyticus* e extração de DNA genômico

A estirpe *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 foi utilizada em todas as análises e gentilmente cedida por Marcia Giambiagi de Malval, Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram estocadas em meio BHI (Difco) meio BHI (Difco) adicionado de 25% de glicerol a -80°C .

As células de *S. saprophyticus* em estoque foram estriadas por esgotamento de alça em placa de Petri contendo meio BHI (Difco) e mantidas em estufa a 36°C por 16 horas. Os experimentos foram realizados a partir da inoculação de uma colônia isolada de *S. saprophyticus* em caldo BHI (Difco) a 36°C por 18 horas, seguida de extração de DNA genômico conforme protocolo de extração utilizando fenol, descrito por Sambrook e Russel, 2001.

O DNA extraído foi eluído em $50\mu\text{L}$ água ultrapura e sua concentração foi medida em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo). Sua concentração foi ajustada para $50\text{ng}/\mu\text{L}$ pela adição de água ultrapura.

4.2 Desenho de oligonucleotídeos

A sequência codificante para a proteína SsaA foi obtida do banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, número de acesso BAE17758.1) e oligonucleotídeos específicos foram desenhados utilizando o software Gene Runner versão 2.1 (**Tabela 1**).

As sequências de oligonucleotídeos foram acrescidas de aproximadamente 15pbs comuns ao vetor de expressão pGEX-4T3 (Promega) e do sítio de restrição reconhecido pela enzima *EcoRI* (Invitrogen) de acordo com o descrito em protocolo para clonagem utilizando sistema In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech).

Os oligonucleotídeos foram testados quanto à especificidade à sequência de interesse através da utilização do software BLAST (NCBI) em comparação ao genoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e foram sintetizados em sistema comercial (IDT).

Tabela 1. Descrição de oligonucleotídeos utilizados, sequência gênica *ssaA* e proteína SsaA.

Descrição	Sequência	Tamanho	Fonte
Gene <i>ssaA</i>	ATGAAAAAAAAATCGCTACAGCTACTATCGCTACTGCAGGAATCGCT ACTTTTGCTTTTGCACAACATGATGCAGATGCAGCAGAAAACAAC AATAGTGGGTACAACCCAAATGACCCAAAGTTCATATAGCTATTCA TATACTATAGATCAACAAGGTCAATACCACTACACTTGGCAAGGT AACTGGAACCCAAGCAACAGTGACCAAGGTCACTAGCAACGGT TACAGCAATGCTAACTCAACTAACAATAATGCAACTCAATCATAT ACAACTAATAACCAAGGTACTGGTGGTAAAGGTGCAGTTTCTCAC TCTACTTCAAACAGCAATGTTAAAGTAAAGTACAACCTAGCGCGCCA TCAAATTCAAATGGTTCAAACCTCAATTTCTAATACTTCAGGTTCT TCAAACAACCTTATACACAGCTGGACAATGTACATATTATGTATAT GACAAAGTTGGTGGTAAAATGGTTCAACTTGGGGTAAACGCTAAC AACTGGGCAAGCGCAGCTGCTGCTTCAGGTACACAGTAAACAAC TCACCTGCTTCAGGTTCAAGTCTTACAATCAACTGCTGGTGGATAT GGCCACGTAGCATACTGTTGAAAATGTAAACAGTGACGGTTCAATC AACGTTTCTGAAATGAACTATGGTCAAGGTGCTGGAGTTGTTACT TCACGTACAATCTCTGCAAGCGAAGCTTCAGGTTACAACCTACATT CACTAA	726 pb	NCBI, número de acesso SSP_RS0 2985
Proteína SsaA	MKKIATATIATAGIATFAFAQHDADAENNSGYNPNDPSSYSYS YTIDQQQYHYTWQGNWNPSNSDQGHTSNGYSNANSTNNNATQSY TTNNQGTGGKGAVSHSTSNVSVSTTSAPSNSNGSNSISNTSGS SNNLYTAGQCTYYVYDKVGGKIGSTWGNANNWASAAAASGYTVNN SPASGSVLQSTAGGYGHVAYVENVNSDGSINVSEMNYGQAGVVT SRTISASEASGYNYIH	25 kDA	NCBI, número de acesso BAE177 58.1
Oligonucleotídio Sentido	5' -GTGGATCCCCGATTCCATGAAAAAAAAATCGCTACAGCT-3'	37 pb	-
Oligonucleotídio Anti-sentido	5' -GTCGACCCGGGAATTCTTAGTGAATGTAGTTGTAAC-3'	36 pb	-

4.3 Amplificação do gene codificante para SsaA por reação de PCR e purificação da reação

A sequência codificante para a proteína SsaA foi amplificada através de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o sistema comercial Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen).

As condições de amplificação se iniciaram com uma etapa de abertura de fita a 94 °C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e extensão da fita a uma temperatura de 72 ° por 2 minutos, e então a reação foi finalizada com uma extensão por 5 minutos à 72 °C.

O resultado da reação foi analisado por Eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo corante GelRed (Uniscience). O produto de amplificação foi purificado através de sistema comercial Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) e dosados em Espectrofotômetro NanoDrop (Thermo).

4.4 Clonagem em vetor de expressão e transformação em bactérias *E. coli*

O vetor comercial pGEX-4T3 (Promega) foi linearizado através de clivagem com enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante e purificado pelo sistema comercial Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) e teve sua concentração dosada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo).

Os fragmentos amplificados e purificados foram ligados ao vetor linearizado em fusão à proteína Glutathione-S-Transferase (GST) através do sistema de clonagem In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) segundo recomendações do fabricante.

Células de *Escherichia coli* linhagem BL21 (DE3) pLysS termocompetentes foram transformadas com o plasmídeos através de choque térmico conforme protocolo (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e mantidas por 16 horas em placas de petri contendo meio BHI (Difco) acrescido de ampicilina e 20 mM de glicose.

4.5 Expressão heteróloga em sistema bacteriano

Colônias isoladas foram analisadas quando à presença do plasmídeo recombinante através de PCR convencional utilizando o *mix* comercial Green Taq Master Mix (Promega), o par de oligonucleotídeos desenhados e condições de amplificação descritas anteriormente. O resultado da reação foi analisado em gel de agarose 1%.

As colônias positivas foram selecionadas para expressão heteróloga da proteína SsaA recombinante, através da utilização de um análogo de lactose IPTG (GE Healthcare) em concentração de 0,5 mM e 1 mM e coletados pontos de 0, 1 e 2 horas à 37 °C. A produção da proteína recombinante foi analisada por aplicação de 25 µl de meio de cultura após indução, em gel unidimensional SDS-Page e foi utilizado Comassie Blue como corante. A colônia que obteve melhor produção da proteína recombinante, bem como o melhor tempo de indução e concentração de IPTG foi selecionada para produção da proteína recombinante em maior escala.

4.6 Produção de anticorpos recombinantes

Após a indução, a proteína recombinante referente ao tamanho esperado foi criteriosamente excisada de gel unidimensional SDS-page, lavada com água ultrapura, macerada e utilizada para imunizar três camundongos isogênicos durante 45 dias. Foram inoculados, por via intraperitoneal, 300µg de proteína recombinante em intervalos de 15 dias.

A acrilamida proveniente do gel unidimensional foi utilizada com a finalidade de potencializar o sistema imune do animal, não existindo a necessidade de adição de adjuvante à resposta imune.

Ao final de 45 dias os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o sangue total foi obtido através de punção cardíaca. Cerca de 1 mL de sangue obtido foi centrifugado a 133.62G por 10 minutos para separação do soro ao qual foi adicionado mesmo volume de uma solução de glicerol à 50%.

4.7 Análise de anticorpos recombinantes por Western Blot

Para teste de sensibilidade e especificidade de anticorpos pela proteína SsaA, 30µg de proteínas secretadas de *S. saprophyticus* foram aplicadas em gel unidimensional SDS-page para separação das proteínas secretadas. Posteriormente essas proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (GE) após incubação por 16 horas à 4 °C e 25 V.

Utilizando a metodologia de Western Blot (Brito et al., 2011), a membrana foi corada com Rouge-Ponceau (Sigma Aldrich) para visualização do marcador molecular. Primeiramente, a membrana foi incubada por 2 horas em tampão de bloqueio contendo leite desnatado (Molico) 5%, Tween-20 0,1% em PBS, seguida por incubação com soro contendo anticorpos policlonais em concentrações de 1:500, 1:750, 1:1000 em tampão de bloqueio por 1 hora e em anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Sigma) também por 1 hora na concentração de 1:1000.

A interação antígeno-anticorpo foi verificada após contato da membrana com solução de revelação contendo BCIP 0,3% e NBT 6,6% em tampão fosfatase alcalina (NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; Tris-HCl 2 mM pH 9,5).

Todas as etapas de incubação foram precedidas de três lavagens com tampão contendo Tween-20 0,1% em PBS. O soro foi então acondicionado a -80° C após adição de 50% de glicerol.

4.8 Infecção experimental de macrófagos

Macrófagos murinos eternizados linhagem J774 1.6 (Banco Celular do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ, número de acesso 0273) foram utilizados para infecção. Os macrófagos foram cultivados a 36°C e 5% CO₂ em meio RPMI (Difco) contendo soro fetal bovino 10% e em solução de aminoácidos não essenciais MEM (Sigma Aldrich).

Os ensaios de fagocitose foram realizados com 10⁵ macrófagos por poço em placas de polipropileno de 6 poços (Greinner Bio-One) contendo meio RPMI descrito previamente, adicionado de IFN- γ (1U/mL) (Sigma Aldrich) durante 24 horas a 36 °C e 5% CO₂ para aderência e ativação.

Para padronização da infecção experimental de macrófagos, uma colônia isolada de cultivo de *S. saprophyticus* em placas de petri contendo BHI (Difco) a 36°C por 18 horas foi inoculada em caldo BHI (Difco) a 36°C sob agitação. Após 18 horas as células foram transferidas na proporção de 1% do volume final de caldo BHI (Difco) novo, e mantidas a 36°C sob agitação até atingirem OD₆₂₀: 0,2 equivalente a 5.10⁷ células por mL (Dey e Bishayi, 2015).

As células foram então centrifugadas por 10 minutos à 133.62G e temperatura de 4°C e tiveram sua concentração ajustada para 5.10⁶ células por mL com adição de meio RPMI (Difco) contendo soro fetal bovino 10% e em solução de aminoácidos não essenciais MEM (Sigma Aldrich) e IFN- γ (1U/mL) (Sigma Aldrich).

O meio contido em placas polipropileno com macrófagos previamente ativados pela adição de IFN- γ (1U/mL) e aderidos à superfície da placa, foi substituído pelo qual continha células de *S. saprophyticus*. Após 30 minutos e 1 hora de incubação à 36°C e 5% de CO₂, o meio foi descartado e os poços lavados três vezes com solução salina 0,9% à -4 °C. Os macrófagos foram lisados por adição de água ultrapura estéril à -4 °C por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 9279.4G à 4 °C, sendo esta suficiente para evitar a lise de células bacterianas.

O produto de lise de macrófagos no sobrenadante foi reservado para testes posteriores. As bactérias internalizadas foram recuperadas, diluídas na proporção de 1:10⁶ em PBS estéril gelado e cultivadas em placas de petri contendo meio BHI (Difco) para contagem de CFU. O mesmo processo havia sido realizado para bactérias não internalizadas contidas no sobrenadante da infecção previamente à lise dos macrófagos.

Simultaneamente à infecção, macrófagos não infectados foram submetidos aos processos de lavagem, lise e centrifugação e cultivo em placa de petri contendo meio BHI (Difco).

4.8.1 Análise da interação de SsaA com proteínas de macrófagos

Os produtos de lise de macrófagos infectados e não infectados foram concentrados em filtro Amicon 3kDA (Sigma Aldrich) e aplicados em gel unidimensional SDS-page. Em processo similar ao realizado para testes dos anticorpos recombinantes através de Western Blot, as proteínas contidas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE) e incubadas com soro contendo anticorpos policlonais anti-SsaA na proporção 1:750.

Como controle negativo, o mesmo processo foi realizado com o produto de lise de macrófagos não infectados com *S. saprophyticus*, e como controle positivo foi utilizado 30µg de proteínas secretadas por *S. saprophyticus*.

4.8.2 Ensaio de imunofluorescência

Macrófagos previamente ativados na proporção 10⁶ por poço de placas de polipropileno de 6 poços (Greinner Bio-One) foram incubados com células de *S. saprophyticus* respeitando-se a proporção e condições descritas previamente. Após 30 minutos de incubação o meio foi descartado e as células lavadas com PBS estéril.

As células foram então fixadas pela adição de metanol puro gelado durante 3 horas à -20 °C. A permeabilização da membrana do macrófago foi realizada utilizando uma solução contendo 0,2% Triton X-100 em PBS por 5 minutos. As células foram incubadas por 30 minutos à 25 °C e ao abrigo de luz, em tampão de bloqueio contendo 5% BSA, 0,2% Tween 20 em PBS segundo Burlak et al., 2007 adaptado. A infecção foi incubada por 1 hora com soro contendo anticorpos policlonais anti-SsaA na proporção

1:750 em tampão de bloqueio, e posteriormente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com FITC (Sigma) por 1 hora.

Após processos de fixação, permeabilização e incubação com tampão de bloqueio e anticorpos, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril. As imagens foram feitas em campo claro e em comprimento de onda de 450-490 nm para visualização do fluoróforo FITC utilizando software AxionVision (Carl Zeiss).

5. RESULTADOS

5.1 Construção do plasmídeo recombinante

A detecção da proteína SsaA no secretoma de *S. saprophyticus* realizada pelo nosso grupo, a similaridade desta com fatores de virulência conhecidos e sua regulação por sistemas conhecidamente responsáveis por esses fatores indicam a possibilidade de sua contribuição como estratégia de sobrevivência utilizada por esse patógeno.

Inicialmente, com o objetivo de elucidar seu papel durante a patogênese através de ensaios com anticorpos recombinantes, a sequência gênica da proteína SsaA foi obtida e foram desenhados oligonucleotídeos específicos acrescidos do sítio de restrição reconhecido pela enzima *EcoRI* e aproximadamente 15pbs comuns ao vetor plasmidial de clonagem pGEX-4T3. O plasmídeo recombinante foi desenhado para que SsaA estivesse fusionada à proteína Glutathione-S-transferase (GST) e tivesse sua expressão induzida pelo *operon lacI* existente no vetor, o qual também continha marca de seleção por resistência à ampicilina (AmpR) (Figura 1).

A análise quanto à amplificação de sequências inespecíficas do genoma de *S. saprophyticus* não gerou correspondências. A amplificação da sequência genômica de SsaA verificada por eletroforese em gel de agarose, gerou um fragmento correspondente ao tamanho esperado de 726pbs.

O vetor pGEX-4T3 foi incubado para clivagem pela enzima de restrição *EcoRI* e também verificado em gel de agarose quanto a sua total linearização por apresentar uma única banda de tamanho 5kpbs, não restando moléculas circulares capazes de transformar células competentes sem a inserção da sequência de interesse.

O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células de *E. coli* termocompetentes, e como controle, células foram transformadas com o vetor plasmidial sem inserção de *ssaA*. As colônias transformadas que tiveram crescimento em meio contendo ampicilina devido à marca de seleção foram ainda rastreadas através de PCR com os oligonucleotídeos específicos à sequência de *ssaA*, e uma colônia positiva foi selecionada (Figura 2).

Para confirmar que a sequência de *ssaA* estava contida no plasmídeo recombinante da colônia selecionada, este foi extraído e clivado com a enzima de restrição *EcoRI*. A visualização por eletroforese em gel de agarose revelou um fragmento correspondente ao vetor de tamanho 5kpbs e uma segunda correspondente ao gene *ssaA* acrescido da sequência de restrição e do vetor de clonagem contidas nos oligonucleotídeos, resultando em um tamanho aproximado à 743pbs, confirmando a integridade do plasmídeo recombinante na colônia *ssaA+*, enquanto a colônia controle apresentou apenas uma banda referente ao vetor (Figura 2).

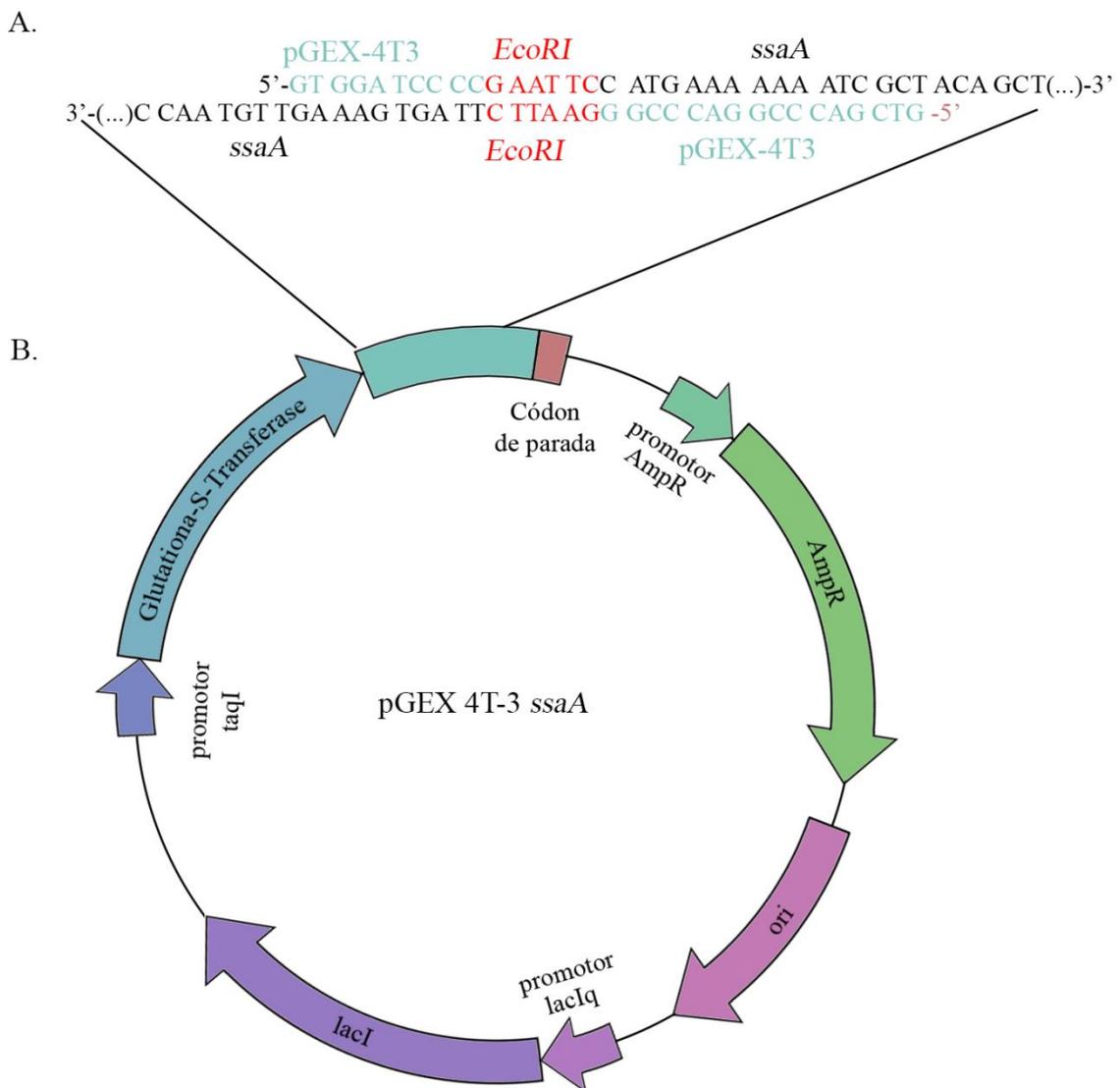


Figura 1. Mapa do vetor Plasmidial recombinante pGEX-4T3 *ssaA*. A. Inserção de *ssaA* no vetor pGEX-4T3 a partir de oligonucleotídeos contendo 10pb e 16pb do vetor de clonagem na porção 5' sentido e antisentido, respectivamente, e sítio de restrição para *EcoRI*. B. O vetor recombinante apresenta marca de seleção por resistência a ampicilina (AmpR), origem de replicação (*ori*), óperon *lacI* e seu promotor, promotor *taqI*, proteína Glutathione-S-Transferase (GST) à qual a *SsaA* foi fusionada e códon de parada.

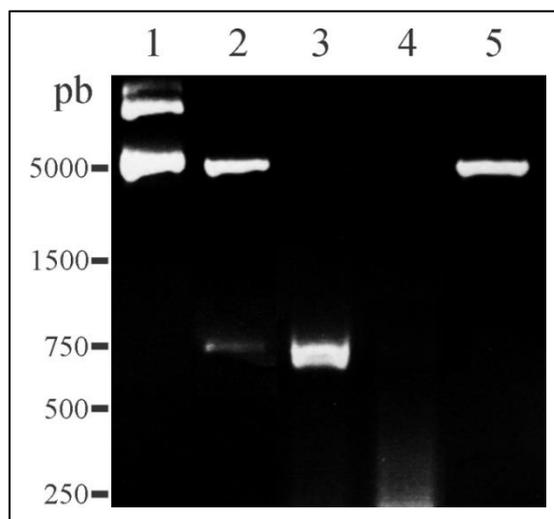


Figura 2. Confirmação da transformação de células de *E. coli* com o plasmídeo recombinante em gel de agarose. 1. Vetor circular utilizado para clonagem pGEX-4T3. 2. Plasmídeo recombinante da colônia *ssaA+* após digestão com enzima de restrição *EcoRI*, liberando um fragmento referente ao vetor e um referente à *ssaA* (seta pequena) 3. Amplificação do gene *ssaA* (seta grande) da colônia selecionada (*ssaA+*) correspondente ao tamanho de 726pb . 4. Controle negativo da reação de amplificação de *ssaA*. 5. Vetor plasmidial da colônia transformada sem inserção de *ssaA*, após digestão com enzima de restrição *EcoRI*.

5.2 Expressão de SsaA

Para indução e otimização da expressão, a colônia *ssaA+* foi incubada à 36 °C em meio de cultura contendo IPTG, análogo à lactose responsável pela ativação do *óperon lacI* contido no vetor plasmidial, permitindo a produção da proteína recombinante, assim como realizado para a colônia controle. A visualização dos níveis de expressão em relação ao tempo de incubação foi realizada através de gel SDS-page (Figura 3).

A colônia controle apresentou indução da proteína GST de tamanho 26kDA (HARPER e SPEICHER, 2011) nos primeiros 30 minutos de incubação com 0,5mM IPTG, diferentemente da colônia *ssaA+*, que apenas após 1 hora de incubação foi possível observar a produção de SsaA fusionada à GST com tamanho final de próximo ao esperado de 51kDA. O tempo de 2 horas de incubação foi selecionado para produção de SsaA por apresentar maior quantidade de proteína recombinante. Como esperado, anteriormente a adição de IPTG, nenhuma das colônias apresentou indução de proteínas, confirmando a integridade do plasmídeo e indução dependente de IPTG (Figura 3).

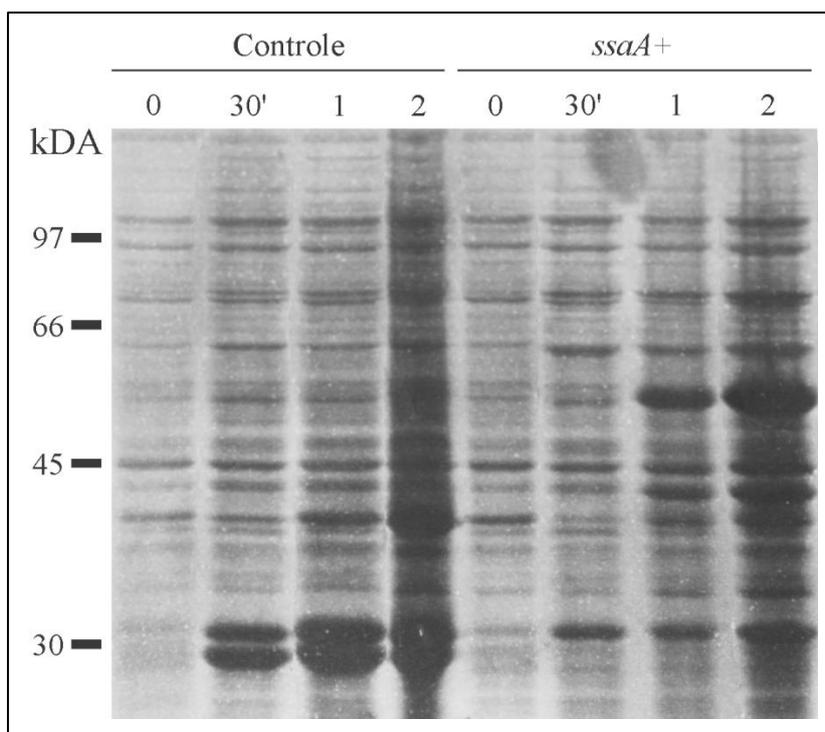


Figura 3. Otimização da expressão de SsaA recombinante em gel unidimensional SDS-page quanto a tempo de incubação com IPTG. 0. Tempo anterior à adição de IPTG. 30'. 30 minutos após a adição de 0,5mM IPTG é possível observar a produção de GST pela colônia controle. 1. Após 1 hora nota-se a presença de SsaA fusionada à GST (aprox.. 51kDA) pela colônia *ssaA+*. 2. Após 2 horas há maior produção de SsaA.

5.3 Produção de anticorpos policlonais

A proteína SsaA foi excisada de gel unidimensional SDS-page e então este fragmento foi macerado e utilizado para imunizar três camundongos para obter-se o soro que continha anticorpos policlonais recombinantes anti-SsaA.

Camundongos expostos à acrilamida apresentam aumento da expressão de genes relacionados à resposta imune e conseqüentemente aumento na produção de anticorpos (KHALIL et al., 2014), logo a porção de gel macerado que continha SsaA recombinante inoculada em camundongos apresentava acrilamida como agente indutor da resposta imune. Ao final das imunizações foi adicionado ao soro obtido mesmo volume de uma solução de glicerol 50% para estocagem, portanto os valores de concentração testados são referentes à concentração de soro estocado com glicerol.

O soro contendo anticorpos anti-SsaA foi testado em concentrações de 1:1000, 1:500 e 1:750 quanto à sensibilidade e especificidade destes à proteína SsaA encontrada no secretoma de *S. saprophyticus* através de Western Blot (Figura 4). É possível detectar anticorpos na proteína SsaA secretada de tamanho 26kDA (Figura 4).

A concentração de soro contendo anticorpos anti-SsaA policlonais de 1:750 foi selecionada como padrão em experimentos posteriores.

5.4 Análise da sobrevivência de *S. saprophyticus* após fagocitose

Com o objetivo de avaliar o perfil de sobrevivência de *S. saprophyticus* após internalização por células fagocíticas, macrófagos eternizados foram incubados com células de *S. saprophyticus* por 30 minutos e 1 hora. Após o tempo de incubação, os macrófagos foram lisados e as células bacterianas internalizadas foram plaqueadas para contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) (Figura 5), o mesmo foi realizado com o sobrenadante da infecção contendo bactérias não internalizadas (Dados não apresentados).

Durante os primeiros 30 minutos de incubação a média de bactérias recuperadas foi de 1075.10^5 CFU/mL (desvio padrão $\pm 170,78$ CFU/mL), e após 1 hora nota-se um declínio de aproximadamente 37% na sobrevivência de *S. saprophyticus* internalizado por macrófagos com média de 400.10^5 CFU/mL (desvio padrão $\pm 81,65$ CFU/mL), determinando o tempo de 30 minutos de incubação como ideal para observação do comportamento de células viáveis. Os dados apresentados são referentes à média de duplicata experimental e biológica.

5.5 Comportamento de SsaA após fagocitose

Para a análise da possível interação entre SsaA e proteínas de macrófagos, os mesmos foram incubados com células de *S. saprophyticus* por 30 minutos e posteriormente lisados. Após centrifugação, as proteínas de macrófagos foram recuperadas e incubadas com anticorpo policlonal anti-SsaA.

Foi observado que SsaA interage com as proteínas dessas células de defesa devido à detecção dos anticorpos específicos em uma região entre 30kDA e 45kDA, ligeiramente acima à região em que é encontrada SsaA livre no controle positivo realizado com as proteínas secretadas, enquanto o controle negativo realizado com proteínas de macrófagos lisados não infectados com *S. saprophyticus*, não revelou nenhuma detecção de anticorpos, confirmando a interação específica entre proteínas de macrófagos e SsaA (Figura 6).

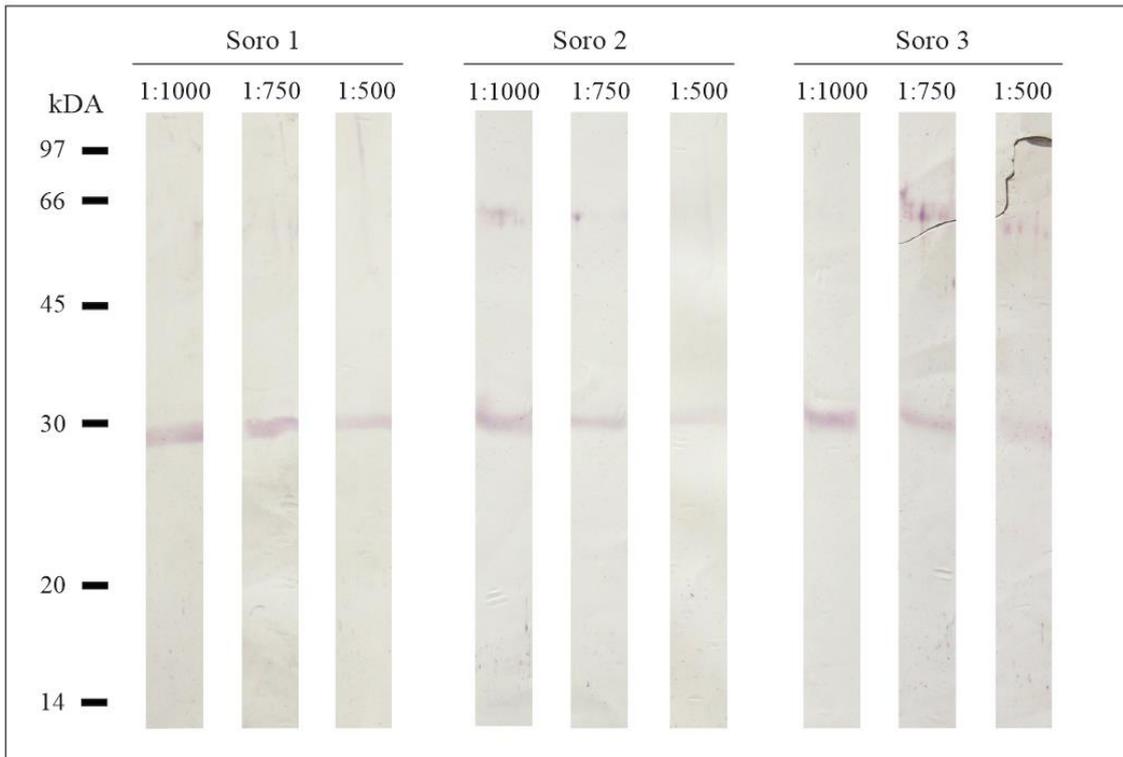


Figura 4. Western Blot com soro contendo anticorpos recombinantes anti-SsaA. Soro 1, Soro 2 e Soro 3 representam o soro de 3 camundongos isogênicos testados em concentrações de 1:1000, 1:750 e 1:500.

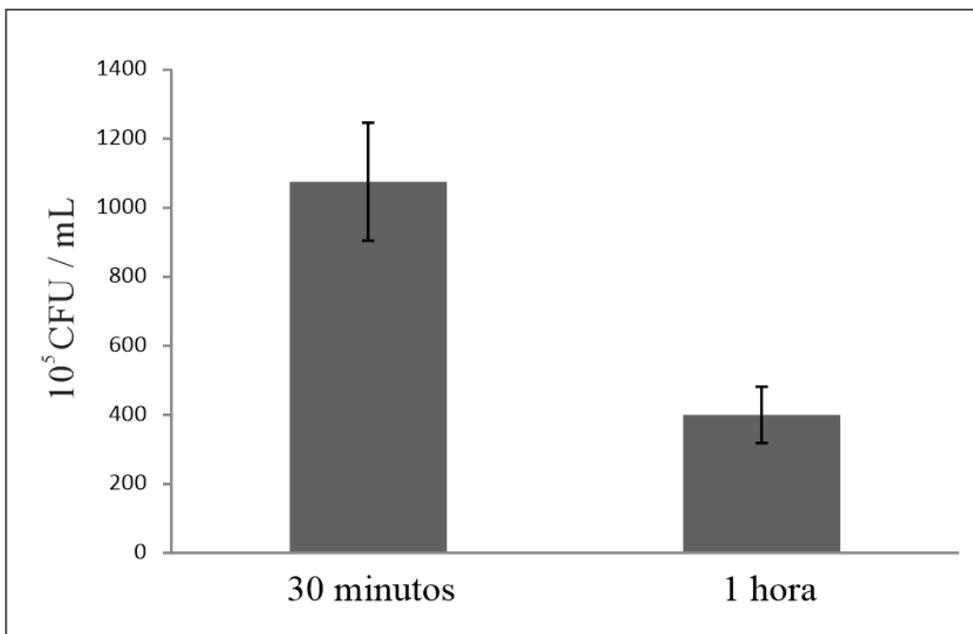


Figura 5. Gráfico da média de unidades formadoras de colônias (CFU) de *S. saprophyticus* recuperadas após fagocitose por macrófagos. Após 30 minutos de incubação a média de duplicata experimental e biológica é de $1075 \cdot 10^5$ CFU/mL com desvio padrão de $\pm 170,78$ CFU/mL, e após 1 hora de incubação a média é de $400 \cdot 10^5$ CFU/mL e desvio padrão $\pm 81,65$ CFU/mL.

Com o objetivo de identificar a secreção dessa proteína no interior da célula fagocítica e analisar seu comportamento dentro de fagossomos, macrófagos infectados com *S. saprophyticus* foram fixados, incubados com anticorpos anti-SsaA marcados e analisados por imunofluorescência.

Foi possível observar que a proteína SsaA é produzida e secretada por *S. saprophyticus* após internalização devido à existência de fluorescência no interior de macrófagos infectados (Figura 7). Em adição, nota-se em menor proporção, pontos de fluorescência possivelmente localizados no interior de fagossomos (seta pequena), enquanto a maior parte da fluorescência, originada da interação entre a proteína SsaA e o anticorpo marcado, se encontra dispersa pelo citoplasma dos macrófagos (setas grandes).

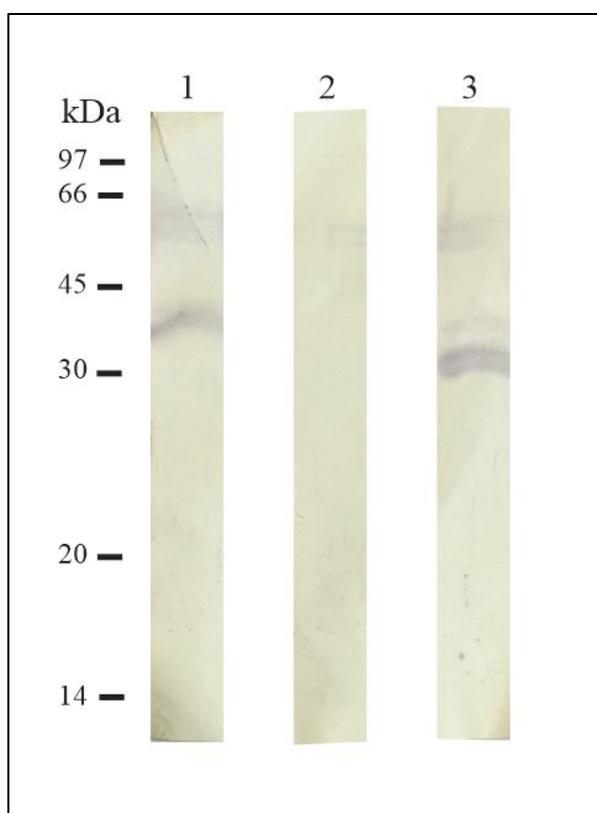


Figura 6. Análise da interação entre SsaA e proteínas de macrófagos o comportamento de SsaA durante infecção de macrófagos. A. Western Blot com proteínas de macrófagos infectados com *S. saprophyticus* (1), proteínas de macrófagos não infectados como controle negativo (2), e proteínas secretadas de *S. saprophyticus* como controle positivo (3) e incubadas com anticorpo anti-SsaA.

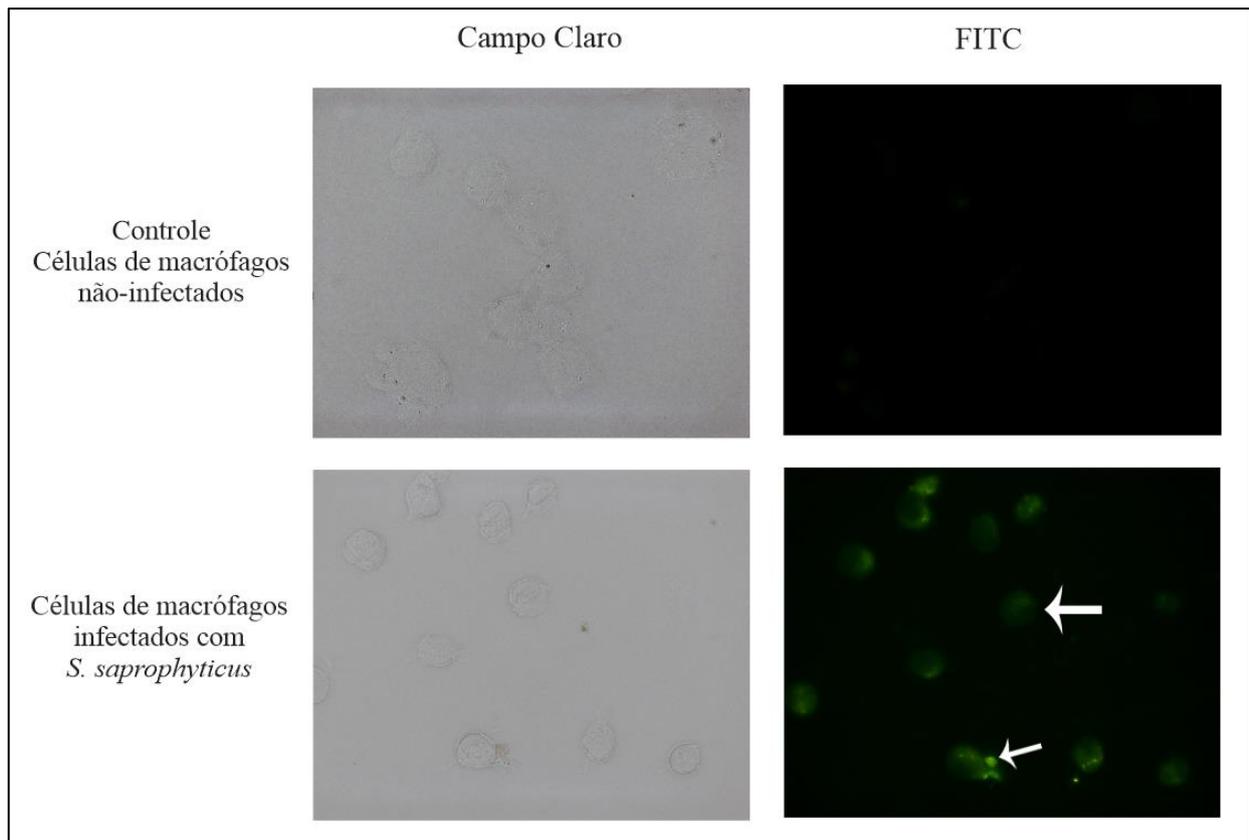


Figura 7. Imunofluorescência durante infecção de macrófagos com *S. saprophyticus* incubados com anti-SsaA. Leitura em campo claro apresentando células de macrófagos intactas e leitura da fluorescência originada pela interação entre SsaA e de anticorpos anti-SsaA marcados com FITC. Macrófagos infectados com *S. saprophyticus* apresentam fluorescência referente à SsaA secretada em seu interior e predominantemente dispersa pelo citoplasma (seta grande), e em menor quantidade limitada ao fagossomo (seta pequena). Controle realizado com células de macrófagos não infectados não revelam fluorescência significativa.

6. DISCUSSÃO

Apesar de algumas semelhanças entre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* evidentemente apresenta mais fatores de virulência conhecidos e níveis de patogenicidade superiores à *S. saprophyticus*. Mesmo frente a relatos de agravamento em infecções urinárias e resistência à meticilina, pouco tem sido elucidado quanto aos mecanismos utilizados por *S. saprophyticus* durante o estabelecimento e manutenção da infecção (MALYSZKO et al., 2014).

Proteínas secretadas contribuem em diversas etapas desse processo, podendo auxiliar uma infecção ativa de células do hospedeiro, garantir proteção ao estresse oxidativo e causar lise de célula fagocítica. Em *S. aureus*, muitas proteínas secretadas são descritas por interagirem com essas células fagocíticas e/ou apresentarem capacidade citolítica, através da formação de poros na membrana de células, enquanto apenas a secreção da proteína urease em *S. saprophyticus* tem sido associada à virulência, e processos citolíticos são associados apenas às proteínas de superfície (GATERMANN e MARRE, 1989).

O Antígeno Secretado Estafilocócico A (SsaA) já havia sido identificado em *S. aureus* e *S. epidermidis*, e parece estar relacionado a fatores de virulência conhecidos, e regulado pelos mesmos sistemas, mas sem determinação do seu papel durante o processo infeccioso. A identificação pelo nosso grupo, dessa proteína também em *S. saprophyticus*, sua alta imunogenicidade em contato com soro de camundongos (OLIVEIRA et al., manuscrito submetido) instigou a tentativa de associar essa proteína a mecanismos de virulência e sua contribuição durante a infecção.

Com este objetivo, foram realizados experimentos para a produção da proteína SsaA recombinante e anticorpos policlonais anti-SsaA, para então utilizá-los em infecções experimentais de macrófagos com células de *S. saprophyticus*.

Foi possível demonstrar que a proteína SsaA tem capacidade de se ligar às proteínas de macrófagos durante a infecção por *S. saprophyticus* (Figura 6). Essa associação entre as duas moléculas conseqüentemente geraria um fragmento de peso molecular maior que o esperado para apenas SsaA livre, e evidentemente a deposição dos anticorpos anti-SsaA específicos foi encontrada em uma região acima à de SsaA.

A elucidação da estrutura de SsaA em *S. saprophyticus* revelou um domínio altamente proteolítico de peptidase/amidohidrolase de cisteína e histidina (CHAP), uma classe de cisteína peptidases (ROSSI et al., 2009). A existência desse domínio proteolítico pode sugerir uma natureza lítica à interação observada entre SsaA e proteínas de macrófagos.

Análises da estrutura de SsaA em *S. aureus* revelaram a presença de peptídeo sinal comum a outros antígenos secretados por bactérias do gênero como lipases e autolisinas, e um domínio similar ao domínio LysM conhecido por sua afinidade pela parede celular (SHIBBALD et al., 2006).

A proteína SsaA também possui em sua estrutura, similaridade de 75,2% com uma proteína associada à biossíntese de estafiloxantina, um antioxidante capaz de aumentar a internalização de *S. aureus*, auxiliar o crescimento no interior de macrófagos e garantir resistência à morte por fagocitose (KULLIK et al., 1998; CLEMENTS e FOSTER, 1999; SHIBBALD et al., 2006; OLIVIER et al., 2009).

Posteriormente, foi observado neste trabalho, a secreção de SsaA no interior da célula fagocítica e sua concentração não limitada ao fagossomos, mas dispersa por todo citoplasma da célula (Figura 7) sugere que esta proteína é utilizada por *S. saprophyticus* durante fagocitose.

Esse fenômeno de dispersão temporal de fatores de virulência e associação com sobrevivência no interior de células fagocíticas, já havia sido relatado por Burlak et al., 2007 para *S. aureus* internalizado por neutrófilos, e a lise de células de defesa causada por proteínas secretadas é conhecidamente um mecanismo utilizado por essa bactéria altamente patogênica, para sobrevivência durante infecção.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notável a importância de proteínas secretadas na patogênese de bactérias do gênero *Staphylococcus*, entretanto *S. saprophyticus*, bactéria responsável por muitos casos e agravamentos de infecções do trato urinário, apresenta poucas proteínas de superfície e apenas a proteína secretada urease, que estejam associadas a mecanismos de virulência.

A proteína secretada SsaA é conservada no gênero *Staphylococcus* e foi identificada pelo nosso grupo em *S. saprophyticus*. Porém, apesar de estar, aparentemente, relacionada a diferentes fatores de virulência como o Antígeno Imunodominante A (IsaA), a proteína Urease, a hidrolase de peptidoglicano LytM, a Proteína Repressora de Toxinas (Rot) e a proteína de choque térmico HslU, e ser uma proteína altamente imunogênica, poucos estudos detectaram sua presença, e nenhum avaliou seu comportamento durante infecção.

Nesse estudo, através da construção de vetor de clonagem contendo a sequência codificante de SsaA de *S. saprophyticus*, expressão heteróloga da proteína recombinante, produção de anticorpos policlonais anti-SsaA e experimentos de fagocitose de *S. saprophyticus*, foi possível verificar que SsaA é secretada no interior de macrófagos e dispersa por todo o citoplasma, bem como, aparentemente possui afinidade às proteínas dessa célula fagocítica.

Estudos enzimáticos posteriores serão necessários para elucidar se SsaA possui atividade lítica durante fagocitose por macrófagos. Análises de mutantes para o gene *SsaA* poderão contribuir para caracterizar esta proteína como fator de virulência e contribuirá para elucidar estratégias utilizadas por *S. saprophyticus* durante infecção no hospedeiro humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLIGNET, J. et al, *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. **Infect. Immun.** v.69, p. 712-718, 2001.
- BOELEN, J. J. et al. Biomaterial associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J. Infect. Dis.*, v.181, p.337-1349, 2000.
- BRITO, W de A. et al. Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Biol.** v. 115, p.697-707, 2011.
- BURLAK, C. et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. **Cell. Microbiol.**, v.9, n.5, p.1172-1190, 2007.
- CEDERGREN, L. et al. Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. **Protein Eng.**, v.6, p.441-448, 1993.
- CHARMBERLAIN, N. R.; BRUEGGEMANN, S. A. Characterization and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. **J. Med. Microbiol.**, v.46, p.693-697, 1997.
- CLEMENTS, M.O.; FOSTER, S.J. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v.7, p.462-485, 1999.
- COMFORT, D. e CLUBB, R. A Comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in Gram-Positive bacteria. **Infect. Immun.**, v.72, p.2710-2722, 2004.
- CORDWELL, S. J. et al. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100. **Microbiol.**, v. 1488, p. 2765-2781, 2002.
- DACK, G.M. et al. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic staphylococcus. *J. Prev. Med.*, v.4, p.167-175, 1930.
- DEY, S.; BISHAYI, B. Killing of *Staphylococcus aureus* in murine macrophages by chloroquine used alone and in combination with ciprofloxacin or azithromycin. *J. Inflamm. Res.* v.8, p.29-47, 2015.

- DUBRAC, S.; MSADEK, T. Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v.186, p.1175–1181, 2004.
- DZIEJMAN, M.; MEKALANOS, J. J. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. **J. Bacteriol.**, p. 305-317, 1995.
- EMORI, T. G. et al. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.428–442, 1993.
- FABRET, C. et al. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. **J. Bacteriol.**, v.180, p.6375–6383, 1998.
- FUKUCHI, K. et al. The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v.146, p.1573–1583, 2000.
- GATERMANN, S. G.; MARRE, R. Cloning and Expression of *Staphylococcus saprophyticus* Urease. **Infection and Immunity**, v.57, n.10, p.2998-3002, 1989.
- GATERMANN, S. G., MEYER, H. G. *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin binds fibronectin. **Infect. Immun.**, v.62, n.10, p.4556-4563, 1994.
- GEMMELL, C. et al. Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A, α -haemolysin and β -toxin deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele-replacement. **Zentralbl. Bakteriol.** v.21, p.273-277, 1991.
- GEOGHEGAN, J. A. et al. Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein A mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. **J. Bacteriol.**, v.195, n.11, p.2675-2683, 2013.
- GLIMAKER, M. et al. Septicemia caused by *Staphylococcus saprophyticus*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.20, p.347-348, 1988.
- GROSS, M. et al. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. **Infect. Immun.**, v.69, p.3423-3426, 2001.

- GUPTA K, et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. **Jama**, v. 281, 1999.
- HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. **Methods Mol Biol**. v.681, p. 681: 259–280, 2011.
- HEDMAN, P.; RINGERTZ, O. Urinary tract infections caused by *Staphylococcus saprophyticus*: A matched case control study. **J Infect**, v.23, p145-143, 1991.
- HEILMANN, C. et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infect. Immun.**, v.64, p.277–282, 1996.
- HELL, W. et al. Cloning *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface proteins with adhesive and autolytic properties. **Mol. Microbiol.**, v.29, n.3, p.871-881, 1998.
- HELL, W. et al. The autolytic activity of the recombinant amidase of *Staphylococcus saprophyticus* is inhibited by its own recombinant GW repeats. **FEMS Microbiol Lett.**, v.227, p.47-51, 2003.
- HIGASHIDE, M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying staphylococcal cassette chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.52, p.2061-2068, 2008.
- JONSSON, M. I. et al, Sigma factor B and RsbU are required for virulence in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis and sepsis. **Infect. Immun.**, v.72, p.6106-6111, 2004.
- JORDAN, E. O. et al. The production by staphylococci of a substance causing food poisoning. **JAMA**, v.94, p.1648-1650, 1930.
- KALLIPOLITIS, B. H. et al. *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. **FEMS Microbiol.Lett**. v.204, p.111–115, 2011.
- KAPRAL, F. A. et al. The esterification of fatty acids by *Staphylococcus aureus* fatty acid modifying enzyme (FAME) and its inhibition by glycerides. **J .Med. Microbiol.**, v.37, p.235-237, 1992.

KHALIL, W. K. B. et al. Toxicological Effects of Acrylamide on Testicular Function and Immune Genes Expression Profile in Rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, v.24, n.27, p.143-151, 2014.

KIM, H. K. et al. Protein A-specific monoclonal antibodies and prevention of *Staphylococcus aureus* disease in mice. **Infect. Immun.**, v.80, p.3460-3470, 2012.

KING, N. P. et al. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. **Microbiology**, v.157, p.1161-1175, 2011.

KING, N. P. et al. Characterization of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance. **BMC Microbiol.**, v.12, n.8, 2012.

KNOBLOCH, J. K. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **J. Bacteriol.**, v.183, p.2624-2633, 2001.

KO, Y. P. et al. Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. **PLOS Pathogens**, v.9, n.12, 2013.

KOHLER, T. et al., Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial fatty acids from human skin. **J. Bacteriol.**, v.191, n.13, p.4482-4484, 2009.

KORTE-BERWANGER, M. et al. Significance of the D-serine-deaminase and D-serine metabolism of *Staphylococcus saprophyticus* for virulence. **Infect. Immun.**, v.81, n.12, p.4525-4533, 2013.

KULLIK, I. et al. Deletion of the alternative sigma factor sigB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. **J. Bacteriol.**, v.180, p.4814-4820, 1998.

KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.357, p.1225-1240, 2001.

- KURODA, M. et al. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. **PNAS**, v.102, n.37, p.13272-13277, 2005.
- LANG, S. et al. Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.29, p.213-220, 2000.
- LANGE, R., C. et al. Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. **Gene**, v.237, p.223–234, 1999.
- LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes & Development**, v.15, p.1725-1752, 2001.
- LINA, G. et al. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **J. Infect.Dis.**, v.189, p.2334-2336, 2004.
- LORENZ, U. et al. Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.29, p.145-153, 2000.
- MALYSZKO, I. et al. T. Detection of a new mecC allotype, mecC2, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. **J. Antimicrob. Chemother.** v.69, p.2003-2005, 2014.
- MARTIN, P. K et al. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.181, p.3666–3673, 1999.
- MARTIN, P. K. et al. Novel locus required for expression of high-level macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.184, p.5810–5813, 2002.
- MARTINEZ, J. J. et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.** v.19, p.2803–2812, 2000.
- MCKEVITT, A. I. et al. Amino acid sequence of a delta-like toxin from *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v.58, p.1473-1475, 1990.

- MEGYERI, K. et al. Induction of cytokine production by different Staphylococcal strains. **Cytokine**. v.19, p.206–212, 2002.
- MERRIMAN, J. A. et al. Novel *Staphylococcus aureus* Secreted Protein Alters Keratinocyte Proliferation and Elicits a Proinflammatory Response In Vitro and In Vivo. **Biochemistry**, v.54, n.31, p.4855-4862, 2015.
- MEYER, H. G. et al. The hemagglutinin of *Staphylococcus saprophyticus* is a major adhesin for uroepithelial cells. **Infect. Immun.**, v.64, p.3893-3896, 1996.
- NICOLLE, L. E. et al. K. Characterization of coagulase negative staphylococci from urinary tract specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.17, p.167-171, 1983.
- NOVICK, R. P.; MUIR, T. W. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, p.40-45, 1999.
- OLIVIER, A. et al. Role of rsbU and Staphyloxanthin in Phagocytosis and Intracellular Growth of *Staphylococcus aureus* in Human Macrophages and Endothelial Cells. **J. Infect. Dis.**, v.200, p.1367–1370, 2009.
- PALMQVIST, N. et al. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. **Microb. Pathog.**, v.33, p.239-249, 2002.
- PANLILIO, A.L., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** v.13, p.582-586, 1992.
- RAAD, I. et al. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. **Clin. Infect. Dis.**, v.26, p.1182-1187, 1998.
- RAZ, R. et al. M. Who Are You – *Staphylococcus saprophyticus*? **Clin. Infect. Dis.**, v.40, p.896-898, 2005.
- RECSEI, P. et al. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. **Mol. Gen. Genet.**, v.202, p.58-61, 1986.
- ROSSI, P. et al. Structural elucidation of the Cys-His-Glu-Asn proteolytic relay in the secreted CHAP domain enzyme from the human pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. **Proteins**, v.74, n.2, p.515-519, 2009.

SAKATA, N. et al. T. Subcellular Location of the Soluble Lytic Transglycosylase Homologue in *Staphylococcus aureus*. **Cur. Microbiol.**, v.50, p.47-51, 2005.

SAKATA, N. et al. Production proçle of the soluble lytic transglycosylase homologue in *Staphylococcus aureus* during bacterial proliferation. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 49, p. 288–295, 2007.

SAKINÇ, T. et al. SdrI, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. **Infect. Immun.**, v.74, p.4615-4623, 2006.

SAKINÇ, T. et al. SdrI of *Staphylococcus saprophyticus* is a multifunctional protein: localization of the fibronectin-binding site. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.301, p.28-34, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2001.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, v.143, p.509-516, 1981.

SHIBBALD, M. J. et al. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.70, n.3, p.755-788, 2006.

SINGH, V. R.; RAAD, I. Fatal *Staphylococcus saprophyticus* native-valve endocarditis in an intravenous drug addict. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.783-784, 1990.

SINHA, B. et al. Heterologously Expressed *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Proteins Are Sufficient for Invasion of Host Cells. **Infect Immun.**, v.68, n.12, p.6871-6878, 2000.

SMITH, T.L. et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. **New Engl. J. Med.**, v.340, p.493-501, 1999.

SPAAN, A. N. et al. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. **Nature Communications**, v.5, n.5438, 2014.

STAPLETON, M. R. et al. Characterization of IsaA and SceD, Two Putative Lytic Transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol**, v. 189, n. 20, p.7316-7325, 2007.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. **J. Leukocyte Biol.**, v.82, p.244-252, 2007.

SZABADOS, F. et al. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. **FEMS Microbiol. Lett.** v.285, p.163-169, 2008;

SZABADOS, F. et al. *Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein (Ssp) is associated with lifespan reduction in *Caenorhabditis elegans*. **Virulence**, v.4, n.7, p.604-611, 2013.

TETI, G. et al. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* adherence to uroepithelial cells by lipoteichoic acid. **Infect. Immun.**, v.55, p.839-842, 1987.

THROUP, J. P. et al. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.** v.35, p.566-576, 2000.

THURLOW, L. R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. **J. Immunol.**, v.186, p.6585-6596, 2011.

TUCHSCHERR, L. et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. **EMBO Mol. Med.**, v.3, p.129-141, 2011.

VUONG, C., et al. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*, **J. Infect. Dis.** v.182, p.1688-1693, 2000.

WAGNER, C. A. et al. Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* vic operon. **Infect. Immun.** v.70, p.6121–6128, 2002.

ZAPOTOCZNA, M. et al. Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. **Cell Microbiol.**,v.15, n.6, p.1026-1041, 2013.