

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

BIANCA SILVA VIEIRA DE SOUZA

**REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE FERRO EM FUNÇÃO DO pH E  
CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS EM  
*Staphylococcus saprophyticus***

Goiânia

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
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:**

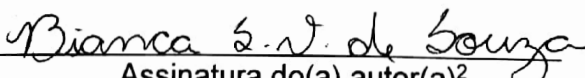
Nome completo do autor: Bianca Silva Vieira de Souza

Título do trabalho: REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE FERRO EM FUNÇÃO DO pH E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS EM *Staphylococcus saprophyticus*

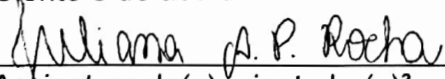
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM      NÃO<sup>1</sup>

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)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 05 / 04 / 2018

<sup>1</sup> 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 embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

BIANCA SILVA VIEIRA DE SOUZA

**REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE FERRO EM FUNÇÃO DO pH E  
CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS EM *Staphylococcus  
saprophyticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Juliana Alves Parente Rocha  
Co-orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Mirelle Garcia Silva Bailão

Goiânia  
2018

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

Silva Vieira de Souza, Bianca  
REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE FERRO EM FUNÇÃO DO pH  
E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS EM  
Staphylococcus saprophyticus [manuscrito] / Bianca Silva Vieira de  
Souza, Juliana Alves Parente Rocha. - 2018.  
x, 52 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Alves Parente Rocha; co  
orientadora Dra. Mirelle Garcia Silva Bailão.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, ,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Cidade  
de Goiás, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos.

1. Proteômica. 2. pH. 3. sideróforos. 4. ferro. 5. infecção urinária. I.  
Alves Parente Rocha, Juliana. II. Alves Parente Rocha, Juliana, orient.  
III. Garcia Silva Bailão, Mirelle, co-orient. IV. Título.

CDU 575



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

1        **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 059**

2        Aos oito dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito  
3        (08/03/2018), às 14hs00min, no (a) Mini auditório do ICB IV, reuniram-se os  
4        componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Juliana Alves Parente**  
5        **Rocha, Profa. Dra. Juliana Lamaro Cardoso e Prof. Dr. Juliano Domiraci**  
6        **Paccez** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado,  
7        procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**Regulação do**  
8        **metabolismo de ferro em função do pH e caracterização da produção de**  
9        **sideróforos em *Staphylococcus saprophyticus***", em nível de mestrado,  
10        área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de  
11        **BIANCA SILVA VIEIRA DE SOUZA**, discente do Programa de Pós-Graduação  
12        em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão  
13        foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da  
14        banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca  
15        de 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada  
16        a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado  
17        o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à  
18        avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº  
19        1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que  
20        regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular,  
21        a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente  
22        cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética  
23        e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso  
24        dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do  
25        programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no  
26        prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de  
27        pauta, às 16 horas e 05 minutos, encerrou-se a sessão de defesa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
e, para constar, eu, Clayton L. Borges, Coordenador do PGBM do Instituto de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que,  
após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em  
três vias de igual teor.

*Juliana A. P. Rocha*

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

*Juliana L. Cardoso*

**Profa. Dra. Juliana Lâmara Cardoso**  
**UFG/GO**

*Juliano Domiraci Pácez*

**Prof. Dr. Juliano Domiraci Pácez**  
**UFG/GO**

Banca examinadora

**Dr<sup>a</sup> Juliana Alves Parente Rocha**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular

**Dr<sup>a</sup> Juliana Lamaro Cardoso**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

**Dr. Juliano Domiraci Paccez**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular

Suplentes:

**Dr. Clayton Luiz Borges**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular

**Dr. Alexandre Melo Bailão**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular

**SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS -**

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$  – micrograma por microlitro

$\mu\text{m}$  – micrometros

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

ACN - acetonitrila

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato

Ar – amostra de referência

As – amostra

BHI – Brain heart infusion (infusão de cérebro e coração).

CAS – Chrome azurol S (sulfonato de cromo azurol ).

DO – densidade óptica

DTT – Ditiotreitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

$\text{Fe}^{2+}$ - ferro no estado ferroso

$\text{Fe}^{3+}$  - ferro no estado férrico

Fur – Ferric uptake regulator

FtnA – ferritina

g - gramas

GPI - Glicosil Fosfatidil Inositol

GltA – citrato sintase

HDTMA – brometo de hexadeciltrimetilamonium

HCL – ácido clorídrico

HemH – ferrochelatase

ITU – infecção do trato urinário

kb – kilo base

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – Kilodaltons

kV - quilovolts

LPS – lipopolissacarideo

mg - miligramas

ml – mililitros

mM – micro molar

M – molar

min – minutos

NaCl – Cloreto de Sódio

ng – nanogramas

LC-ESI-UPLC – Cromatografia líquida de alta performance acoplada a fonte de nano eletrospray

PBS – Tampão de fosfatase salina

PIPES – Piperazina

pH - Potencial Hidrogeniônico

PNAG - poli-N- acetilglicosamina

ppm – partes por milhão

pSSAP1 e pSSAP2 – Plasmídeos da cepa ATCC 15305

rpm – rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute médium (Meio do Instituto Park Memorial Roswell).

SCN – Estafilococos coagulase-negativa

SCP - Estafilococos coagulase-positiva

Sdrl – Serina-Aspartate Repeat Protein I SDS – Sódio Dodecil Sulfato

SOD – Supéroxido dismutase

SS - Staphylococcal siderophore detection (detecção dos sideróforos de estafilococcus)

Ssp – *Staphylococcus saprophyticus* proteína de superfície associada

SssF – *Staphylococcus saprophyticus* proteína de superfície F

TGU – Trato Genito-Urinário

TFA - ácido trifluoroacético

UFC - unidade formadora de colônias

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Representação esquemática da aquisição de ferro mediada por sideróforos em (A) bactérias gram-negativas e (B) bactérias gram positivas. (Retirada de: FEMS Microbiology Reviews, 27/3, Andrews, S.C., Robinson, A.K, Rodriguez-Quinones, Bacterial iron homeostasis, 215-237, Copyright 2003).-----18

**Figura 2** - Curva de crescimento celular de *S. saprophyticus* em pHs 5.5, 7.0 e 9.0. O experimento foi realizado em meio BHI em triplicata em placa de 96 poços. A absorbância foi obtida em equipamento de espectrofotometria utilizando 660 nm de comprimento de onda.-----27

**Figura 3** – Curva de crescimento em meio SSD sem ferro e nas concentrações de 0.1, 0.5, 1, 5 e 10 ng de ferro da cepa ATCC15305 e 9325 da bactéria *Staphylococcus saprophyticus*. -----32

**Figura 4** – Ensaio CAS para detecção de sideróforos. Em azul – controle apenas meio CAS e meio SSD estéril. Em amarelo – meio CAS com meio SSD em que foram crescidas as bactérias. A mudança de cor é uma evidência da presença dos sideróforos e de sua provável origem a partir de citrato, formando carboxilatos.--33

**Figura 5** – Produção de sideróforos pela bactéria *Staphylococcus Saprophyticus* durante 48 horas de incubação em meio SSD sem ferro e com 7uM de ferro. O asterisco denota significância estatística utilizando teste t de Student (p valor ≤ 0,05).-----34

**Figura 6** - Teste de Shenker de detecção de sideróforo. O sobrenadante de cultura de *S. saprophyticus* em meio SSD sem ferro foi liofilizado e os sideróforos foram extraído com metanol. O controle foi realizado com meio SSD sem ferro esterilizado, nas mesmas condições.-----35

**Figura 7-** Contagem de colônias recuperadas após a fagocitose dos macrófagos durante duas horas. Os macrófagos foram infectados com células de *S.saprophyticus* cultivadas em meio com e ferro sem ferro.-----35

**LISTA DE TABELAS -**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Genes relacionados ao metabolismo de ferro em <i>S. saprophyticus</i> , identificados por análises <i>in silico</i> de homologia.----- | 19 |
| <b>Tabela 2</b> - Proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro reguladas nas condições ácida e básica.-----  | 29 |
| <b>Table S1</b> – <i>S. saprophyticus</i> up-regulated proteins in response to acid pH treatment.-----   | 46 |
| <b>Table S2</b> – <i>S. saprophyticus</i> down-regulated proteins in response to acid pH treatment.-----   | 47 |
| <b>Table S3</b> - <i>S. saprophyticus</i> up-regulated proteins in response to alkaline pH treatment.-----   | 49 |
| <b>Table S4</b> - <i>S. saprophyticus</i> down-regulated proteins in response to alkaline pH treatment.-----   | 50 |

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS  | iv  |
| LISTA DE FIGURAS – adicionar a página  | vi  |
| LISTA DE TABELAS - adicionar a página  | vii |
| RESUMO   | ix  |
| ABSTRACT   | x   |
| 1.0 INTRODUÇÃO   | 11  |
| 1.1 – O Gênero <i>Staphylococcus</i>   | 11  |
| 1.2 – Estabelecimento da infecção por <i>S. saprophyticus</i>  | 12  |
| 1.3 – O ferro como micronutriente  | 14  |
| 1.4 – Mecanismos de captação de ferro em microrganismos  | 16  |
| 3.0 - OBJETIVOS  | 22  |
| 4.0 – METODOLOGIA - DEIXAR MENOS CONFUSA E COLOCAR TODAS AS MARCAS E ANO DOS REAGENTES UTILIADOS   | 23  |
| 4.1 - Cultivo e manutenção de <i>S. saprophyticus</i>  | 23  |
| 4.2 - Curva de crescimento de <i>S. saprophyticus</i> em pHs ácido, neutro e alcalino e curva de crescimento em meio SSD da presença e ausência de ferro | 23  |
| 4.3- Extração de proteínas totais de <i>S. saprophyticus</i>   | 23  |
| 4.4- Preparação das amostras para espectrometria de massas   | 24  |
| 4.5 - Espectrometria de massas para identificação de proteínas de <i>S. saprophyticus</i>  | 24  |
| 4.6 - Análise <i>in silico</i> de genes codificantes para proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro em <i>S. saprophyticus</i>                      | 25  |
| 4.7 - Ensaio de detecção de sideróforos de <i>S. saprophyticus</i>   | 25  |
| 4.8 – Extração de sideróforos com metanol  | 26  |
| 4.9 – Ensaio para classificação do sideróforo do tipo Carboxilato  | 26  |
| 4.10 - Ensaio de fagocitose de <i>S. saprophyticus</i> por macrófagos eternizados após privação de ferro   | 26  |
| 5.0 - RESULTADOS OBTIDOS   | 27  |
| 5.1 - Avaliação do crescimento de <i>S. saprophyticus</i> em pHs 5,5; 7 e 9  | 27  |
| 5.2 – Regulação de proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro de <i>S. saprophyticus</i> em resposta aos estresses ácido e alcalino.                 | 28  |
| 5.3 – Avaliação da capacidade de crescimento celular de <i>S. saprophyticus</i> em concentrações variadas de ferro                                       | 31  |
| 5.4 – Avaliação da produção de sideróforos por <i>S. saprophyticus</i>   | 32  |
| 5.5 – Ensaio de sobrevivência em macrófagos  | 35  |
| 6.0 - CONCLUSÕES   | 37  |
| 7.0 – PERSPECTIVAS FUTURAS   | 38  |
| 8.0 - REFERÊNCIAS  | 38  |
| 9.0 – MATERIAL SUPLEMENTAR   | 46  |

## RESUMO

*Staphylococcus saprophyticus* é uma bactéria coagulase negativa que faz parte da microbiota humana, podendo também ser encontrado em superfícies, alimentos e meio ambiente. Pode atuar como patógeno causando infecções de trato-geniturinário (ITU) em seres humanos. A capacidade de captar micro e macro nutrientes está relacionada com a habilidade de sobrevivência e estabelecimento de infecção em microrganismos patogênicos. Uma desses micronutrientes é o ferro, que pode ser adquirido por microrganismos através de sideróforos secretados ou sistema redutor de ferro na superfície celular. Quando a infecção por *S. saprophyticus* é iniciada a bactéria ocasiona mudanças no meio, tendo como consequência a variação do pH da urina. O ferro pode ser encontrado na forma solúvel ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em maior concentração em pH ácido, e insolúvel ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em maior concentração em pH básico. Neste estudo o perfil proteômico de *S. saprophyticus* quando cultivado em pH ácido e básico foi avaliado. Os resultados demonstram que *S. saprophyticus* responde às alterações de pH modulando proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro. Foi investigada também a capacidade de produção de sideróforos por *S. saprophyticus* após cultivo em meio mínimo SSD sem ferro. Os resultados demonstram que esta bactéria produz sideróforos do tipo carboxilato quando cultivado na ausência de ferro. Ensaio de fagocitose em macrófagos demonstram que *S. saprophyticus* é mais suscetível à morte após infecção quando previamente privado de ferro, demonstrando que este elemento é importante para garantir a infecção. O presente estudo amplia o conhecimento da flexibilidade proteômica e metabólica de *S. saprophyticus* em resposta às alterações de níveis de ferro extracelular.

Palavras chave: Proteômica; pH; sideróforos; ferro; infecção urinária.

## ABSTRACT

*Staphylococcus saprophyticus* is a coagulase negative bacteria that is part of the human microbiota and may also be present in surfaces, food and the environment. It can act as a pathogen causing urinary tract infections (UTIs) in humans. The ability to capture micro and macro nutrients is related to the ability to survive and establish infection in pathogenic microorganisms. One of the micronutrients is iron, which can be acquired by microorganisms through secret siderophores or iron-reducing system on the cell surface. When *S. saprophyticus* infection is initiated the bacteria causes changes in the medium, resulting in a change in the pH of the urine. Iron can be found in soluble form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in higher concentration at acid pH, and insoluble ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in higher concentration at basic pH. In this study, the proteomic profile of *S. saprophyticus* when grown at acidic and basic pH was evaluated. The results demonstrate that *S. saprophyticus* respond to the instances of modulating the pH of proteins related to iron metabolism. A siderophores production capacity by *S. saprophyticus* was also investigated after culturing in minimal SSD medium without iron. The results demonstrate that this bacteria produces siderophores of the carboxylate type when cultivated in the absence of iron. Phagocytosis assays in macrophages demonstrate that *S. saprophyticus* is more susceptible to death after infection when they are deprived of iron, demonstrating that this element is important to ensure infection. The present study increased the knowledge of the proteomic and metabolic flexibility of *S. saprophyticus* in response to extracellular iron levels.

Keywords: Proteomics; pH; siderophores; iron; urinary infection.

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 – O Gênero *Staphylococcus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos que se apresentam agrupados em uma estrutura semelhante a cachos de uva, os quais podem ser divididos em dois grupos distintos, baseados na presença ou ausência da atividade de coagulase: *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) (Widerström *et al.* 2012)

O gênero consiste atualmente, de acordo com a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, organizada pelo pesquisador J.P. Euzéby, em 49 espécies e 26 subespécies, muitas das quais são encontradas em nichos específicos de importância clínica para os seres humanos, pois causam doenças sistêmicas, incluindo infecções de pele, tecidos moles, ossos e trato urinário (Parte 2014)

Entre as espécies coagulase positivas, *S. aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo, portanto, a espécie mais extensivamente estudada. *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias com maior nível de atenção da saúde pública mundial sendo a espécie do gênero com mecanismos de virulência bem descritos, podendo se espalhar facilmente no hospedeiro debilitado, causando patologias, tais como pneumonia, impetigo, mastite, meningite, endocardite, ou até um quadro de septicemia, este último acometendo principalmente pacientes imuno comprometidos (Dreisbach *et al* 2011)

As espécies coagulase negativas também são consideradas como importantes causadoras de infecção no ambiente hospitalar, principalmente em pacientes imuno comprometidos, ou portadores de corpos estranhos, como próteses, cateteres e enxertos sintéticos. (Widerström *et al.* 2012)

As espécies mais comuns associadas a infecções humanas são *S.aureus* (o mais conhecido e o mais virulento do gênero), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus*. *Staphylococcus spp.* podem causar diversas doenças no hospedeiro. *Staphylococcus saprophyticus* apresenta relevância para a saúde pública, pois é comumente encontrado no trato genito-urinário de mulheres jovens, podendo causar doenças urinárias (Sakinc *et al.* 2005; Widerström *et al.* 2012; Higashide *et al.* 2008; Kleine, Gattermann, and Sakinc 2010; King *et al.* 2012, 2011)

*S. saprophyticus* causa cerca de 40% das infecções no trato genito-urinário (TGU) em mulheres jovens sexualmente ativas, ficando somente atrás de *Escherichia coli*, sendo que os sintomas de infecção de ambas as espécies indiferenciáveis em termos clínicos (Park et al. 2010; King et al. 2011) O genoma de *S. saprophyticus* (ATCC 15305) foi sequenciado por Kuroda e colaboradores, em 2005. *S. saprophyticus* produz uma cápsula polissacarídica, desprovida de poli-N-acetilglicosamina (PNAG) ou ácido poliglutâmico que é pouco frequente, encontrada em 1,3% das cepas clínicas (Luong et al. 2002; Kuroda et al. 2005; Park et al. 2010).

Pelo fato destas bactérias serem encontradas na pele e nas vias aéreas, sua disseminação no meio ambiente é extremamente comum. A espécie coagulase negativa mais conhecida e estudada é *S. epidermidis*, responsável por infecções humanas adquiridas em hospitais, principalmente aquelas relacionadas a cirurgias para inserção de cateteres e próteses.(Heikens et al. 2005).

## 1.2 – Estabelecimento da infecção por *S. saprophyticus*

O trato geniturinário humano pode ser infectado por inúmeros microrganismos patogênicos, levando a danos no sistema urinário como a uretrite, cistite, pielonefrite e formação de pedras urinárias (Loes et al. 2014).

Estudos relatam maior incidência em mulheres jovens, essa incidência pode ser explicada pelas mudanças hormonais comuns da fase reprodutiva, e também associada a relação sexual recente em mulheres em idade fértil. Mudanças na microbiota vaginal causadas por infecções por *Candida spp.* ou por espermicidas presentes no preservativo, também podem estimular a colonização por *S. saprophyticus* em mulheres (OLIVEIRA, et al., 2016).

Estudos constataram uma prevalência significativa de infecções por *S. saprophyticus* em mulheres grávidas. A taxa foi de 83,4 % de mulheres infectadas na faixa dos 15 a 44 anos, sendo que 13,4 % delas estavam em período de gestação *S. saprophyticus* também é capaz de infectar homens em todas as faixas etárias, podendo causar uretrite, prostatite, epididimite e nefrolitíase. (Orden-Martínez et al 2008).

A urina normal (de um indivíduo saudável) apresenta fatores que podem contribuir para evitar a infecção, conhecidos como fatores antibacterianos da urina. Estes são: pH baixo, a elevada osmolaridade, anticorpos, altas concentrações de

ureia e a presença do aminoácido D-serina, que tem atividade bacteriostática (Heilberg and Schor 2003) .

A mucosa da bexiga é recoberta por uma camada de oligossacarídeos e mucopolissacarídeos que inibem a adesão bacteriana ao urotélio. A peristalse ureteral e a existência de mecanismos de válvula protegem quanto à progressão bacteriana para o trato urinário superior. As secreções prostáticas ricas em zinco apresentam funções protetoras contra a infecção e o próprio ato da micção promove lavagem da uretra e da bexiga, reduzindo a população bacteriana local (Heilberg & Schor 2003). Nos quadros de obstrução ou estase do trato urinário, o fenômeno de lavagem bacteriana se atenua, favorecendo o aparecimento de infecções locais (Ipe *et al.* 2016).

O sistema imunológico do hospedeiro também tem papel ativo na prevenção e resolução da ITU. O reconhecimento do patógeno pela bexiga é mediado por receptores moleculares presentes no urotélio, que reconhecem lipossacarídeos e glicopeptídeos comuns a diversos micro-organismos. Estes receptores sinalizam ao sistema e dão início a uma resposta imune e inflamatória (Medzhitov 2008)

A produção de citocinas e o influxo de neutrófilos ocorrem pela presença de produtos bacterianos dentro do trato urinário. As interações entre as adesinas das bactérias patogênicas que estão infectando a bexiga e as células epiteliais e as células imunes do hospedeiro estimulam a expressão de várias moléculas pré – inflamatórias, interleucinas e seus receptores. As moléculas de reconhecimento padrão (receptores toll like) permitem que as células epiteliais do trato urinário detectem e combatam os constituintes bacterianos, como LPS e lipoproteínas, levando a sinalização transmembrana e alteração celular. (Moura & Fernandes 2010).

A capacidade de adesão bacteriana ao urotélio se faz pela ligação de elementos filamentosos (fímbrias ou pili) existentes na superfície bacteriana a receptores celulares. Em indivíduos não propensos a ITUs esses receptores estão provavelmente recobertos por anticorpos existentes no fluido vaginal e uretral, o que impede a aderência local das bactérias e reduz a colonização vaginal e uretral. Por outro lado, em mulheres com propensão a infecções urinárias, observa-se maior aderência de cepas de *E. coli* às células do epitélio vaginal (Heilberg and Schor 2003).

Existem evidências que sugerem um componente genético facilitador para recorrência da cistite bacteriana em mulheres. Mulheres com cistite bacteriana recorrente foram estudadas em comparação com mulheres normais e observou-se que as primeiras apresentavam maior receptividade a aderência das fímbrias bacterianas nas células dos epitélios vaginal, uretral e oral (Cronan *et al* 2005).

*S. saprophyticus* produz muitas proteínas extracelulares associadas às células do hospedeiro. Essas proteínas são importantes na colonização e no crescimento de estafilos nos vários tecidos. Uma proteína secretada caracterizada como fator de virulência importante em *S. saprophyticus* é a proteína urease, que catalisa a conversão de uréia em dióxido de carbono e amônia. Como consequência da produção de amônia, ocorre o aumento do pH do meio. Em *S. saprophyticus*, a urease pode contribuir para o crescimento invasivo (Gatermann & Marre 1989).

Além dos fatores de virulência citados acima, a capacidade de microrganismos captarem moléculas extracelulares, como macro e micronutrientes, é importante para garantir sobrevivência e multiplicação durante infecção. Uma dessas moléculas é o ferro, que pode ser captado por moléculas denominadas sideróforos ou por sistema redutivo férrico (Ipe *et al.* 2016).

### 1.3 – O ferro como micronutriente

O ferro, metal de transição de número atômico 26 da tabela periódica, é o quarto elemento mais abundante na Terra; apesar de sua abundância, é insolúvel no meio ambiente. Nos sistemas biológicos, se encontra em dois estados de oxidação: ferroso ( $Fe^{2+}$ ) e férrico ( $Fe^{3+}$ ). Em soluções aquosas, o ferro no estado ferroso é rapidamente oxidado ao estado férrico, insolúvel em pH fisiológico. Neste sentido, para que seja mantido em solução e ser utilizado pelo organismo, o ferro necessita sempre estar unido a compostos quelantes. Estes, como a transferrina no plasma, são sintetizados pelo organismo e fundamentais na captação, no transporte e estoque do metal (Martínez *et al* 1990).

O homem adulto possui em torno de 35 mg a 45 mg de ferro por quilograma de peso. As mulheres em idade fértil possuem depósitos de ferro menores em consequência da perda de sangue periódica na menstruação. Mais de dois terços do conteúdo do ferro do organismo encontram-se na molécula de hemoglobina. Aproximadamente 1 ml de concentrado de hemácias contém 1 mg de ferro e este corresponde a 0,34% do peso da hemoglobina. No homem, cerca de 2 g de ferro

estão nas hemoglobinas, enquanto nas mulheres este valor corresponde a 1,7 g. Uma hemácia contém bilhões de átomos de ferro. Apesar da maioria do ferro do organismo se encontrar na hemoglobina, ele também é armazenado em diferentes tecidos, tanto na forma de ferritina como de hemossiderina. O tamanho dos depósitos de ferro é variável, mas equivale a 800 a 1000 mg em um homem adulto, enquanto na mulher este valor representa, em média, cerca de 300 mg. No fígado e no baço, o ferro está armazenado predominantemente na forma de ferritina. A ferritina encontra-se presente em praticamente todas as células do organismo, assim como nos fluidos orgânicos (Macara *et al* 1973).

Uma das estratégias do hospedeiro para dificultar ou impedir a infecção por microrganismos é privá-lo de micronutrientes, como o ferro. Desta forma, complexar este metal a outras moléculas, tais como hemoglobina, ferritina e transferrina é também uma estratégia de defesa denominada imunidade nutricional (revisado por Bilitewski *et al.* 2017). Estudos utilizando modelo animal sugerem que alguns organismos que passam parte do seu ciclo vital intracelularmente, como o *Plasmodium* (protozoário causador da malária), as micobactérias *Salmonella invasiva* e *Yersinia* apresentam crescimento e virulência prejudicados pela deficiência de ferro e são beneficiados pela terapia com esse mineral (Oppenheimer *et al.* 1986; Oppenheimer 2001; Bilitewski *et al.* 2017).

Para grande parcela das bactérias, o ferro presente em seu ambiente de (Andrews, Robinson, and Rodríguez-Quiñones 2003; Hood and Skaar 2012) crescimento não se encontra prontamente disponível para ser utilizado. Em ambientes aeróbios e de pH neutro ou básico, o ferro, na forma oxidada, está predominantemente insolúvel e precisa ser complexado e solubilizado para captação. Bactérias patogênicas encontram o ferro complexado com ácidos orgânicos ou proteínas do hospedeiro. Além disso, o ferro encontrado no hospedeiro tende a estar em concentração reduzida como estratégia para combater a infecção. Para a obtenção do metal as bactérias se utilizam de mecanismos de captação de ferro extremamente específicos, que garantem sua adaptação diante de condições adversas (Andrews *et al* 2003; Hood and Skaar 2012).

A forma mais eficiente para captação de ferro extracelular encontrada por bactérias se dá através da síntese de sideróforos (Miethke & Marahiel 2007), já citados anteriormente. A homeostase de ferro é regulada de acordo com a disponibilidade de ferro no meio. Para muitas bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas, o balanço crucial entre capturar quantidade de ferro suficiente para crescer e sobreviver e evitar os efeitos tóxicos do excesso deste metal é controlado pelo fator transcricional Fur (Ferric uptake regulator) (Crosa 1997; Hantke 2001).

#### 1.4 – Mecanismos de captação de ferro em microrganismos

Existem dois sistemas básicos de captação de ferro em microrganismos: sistema de redução de ferro por ferritinas e captação por secreção ou captação de sideróforos.

As ferritinas são proteínas conservadas desde bactérias até eucariotos superiores. Ao mesmo tempo em que estas proteínas têm função de reserva, elas também podem disponibilizar ferro quando necessário. Com isso, elas desempenham papel fundamental no controle de concentrações intracelulares de ferro com a função de reservar ferro de uma forma não tóxica e biodisponível (Macara *et al* 1973).

Como proposto originalmente, o processo de acúmulo e mineralização de ferro na cavidade interna da ferritina segue os seguintes passos: primeiro, o  $Fe^{2+}$  liga-se e é oxidado a  $Fe^{3+}$  nos centros catalíticos da proteína; em seguida, conjuntos de ferro (núcleos) são formados na cavidade interna gerando um mineral cristalino (ferrihidreto) e, por último, estes núcleos servem como uma superfície sobre a qual outros íons  $Fe^{2+}$  serão depositados e oxidados. É importante salientar que cada subunidade possui atividade catalítica para oxidar o íon  $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$  (Macara *et al* 1973).

Sideróforos são moléculas quelantes de ferro de baixo peso molecular (do grego *sideros* = ferro, *foros* = transportador). Os sideróforos são capazes de retirar o ferro das proteínas carreadoras (hemoglobina, transferrina e lactoferrina) e transportar para o citoplasma (Miethke & Marahiel 2007; Dimkpa *et al.* 2008).

Atualmente, existem mais de 500 siderofóros descritos, sendo que 270 deles já foram caracterizados estruturalmente. Embora as estruturas dessas moléculas difiram bastante, a natureza química dos grupos funcionais que interagem com o átomo de ferro não são tão diversos, sendo basicamente compostos de ácido hidroxicarboxílico, ácido fênico, catecol ou ácido hidroxâmico e, assim, classificados como sideróforos do tipo hidroxicarboxilatos (carboxilatos), fenolatos, catecolatos e hidroxamatos (Miethke & Marahiel 2007).

Os micro-organismos podem produzir mais de um tipo de sideróforo. A aquisição de sideróforos produzidos por outras espécies microbianas já foi descrita para bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (DIARRA *et al.*, 1996), *Streptomyces Sp.*, *Arthrobacter flavescens* (Martínez *et al* 1990; Dimkpa *et al.* 2008; Oppenheimer 2001).

Os processos químicos necessários para a solubilização e captação de ferro mediado por sideróforos são: quelação seletiva de  $Fe^{3+}$ ; reconhecimento molecular do complexo sideróforo- $Fe^{3+}$ ; transporte de ferro complexado através da membrana celular; deposição do ferro, dentro de um sítio apropriado na célula (superfície ou interior celular) (Benite *et al* 2002).

O último processo envolve finalmente a troca do ligante, que pode ou não ser precedida pela redução de  $Fe^{3+}$  e/ou pela hidrólise do ligante (ALBRECHT-GARY, 1998).

Embora sua principal função seja adquirir ferro de hidróxidos insolúveis ou de ferro adsorvido para superfícies sólidas, os sideróforos também podem extrair ferro de vários outros compostos que contenham ferro solúvel ou insolúvel, tais como citrato férrico, fosfato férrico, transferrina, ferritina ou ferro ligado a açúcares, pigmentos de flavona de planta e glicosídeos ou mesmo de quelantes artificiais como EDTA e nitrilotriacetato. Assim, mesmo que os sideróforos não estejam diretamente envolvidos na solubilização do ferro, são necessários como transportadoras que medeiam troca entre o meio extracelular e sistemas de transporte de membranas. Algumas características importantes, apresentadas pelo íon  $Fe^{3+}$ , que garantem sua seletividade do mesmo são: a dureza deste íon metálico; o tamanho, a configuração dos elétrons, a alta densidade de carga, e a alta eletronegatividade. (Miethke & Marahiel 2007).

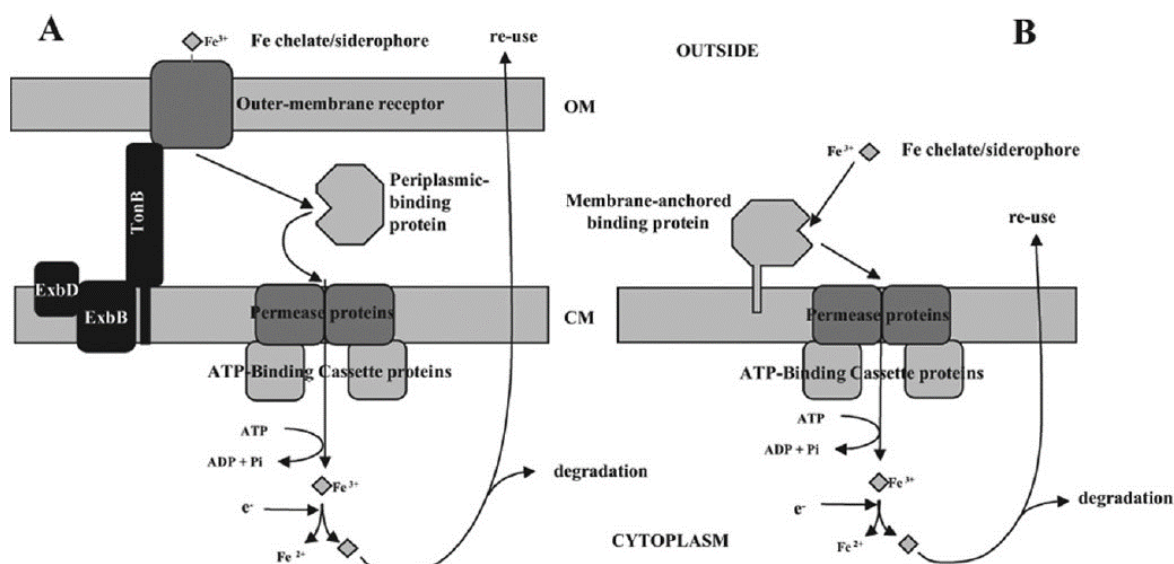
No tratamento da malária um considerável número de quelantes de  $Fe^{3+}$ , cujos sítios de complexação são hidroxamatos, têm sido propostos como agentes terapêuticos. Estes são capazes de acessar as células infectadas e remover ferro dos parasitas intracelulares interrompendo, desta forma, o ciclo da doença (Mabeza *et al.* 1999).

Também no tratamento da tuberculose, cólera e lepra, os sideróforos têm alcançado desempenho satisfatório na interrupção do ciclo da doença. Vários antibióticos potentes têm sido descobertos mimetizando o centro de coordenação de Fe(III) dos sideróforos e, portanto, tendo acesso ao citoplasma da bactéria via

sistemas de transporte destes. Uma vez dentro das células a metade ativa do antibiótico é clivada. Desta forma, sideróforos têm sido usados como transportadores para antibióticos sintéticos (Diarra *et al.* 1996).

O mecanismo de captação de ferro por sideróforos, primeiramente identificado no gênero *Staphylococcus*, é mediado por uma proteína da parede celular que contém um sítio de ligação a transferrina. Dessa forma, a proteína de superfície se liga a transferrina, removendo o ferro complexado. Os passos seguintes incluem a transferência do ferro para a superfície por lipoproteínas, e em seguida ocorre o transporte do ferro para o interior da célula por transportadores específicos (Miethke & Marahiel 2007).

Estudos tem demonstrado que bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são capazes de secretar dois tipos de sideróforos, estafiloferrina A e B, que são moléculas do tipo carboxilato (Haag *et al.* 1994; Drechsel *et al.* 1993).



**Figura 1** - Representação esquemática da aquisição de ferro mediada por sideróforos em (A) bactérias gram-negativas e (B) bactérias gram positivas. (Retirada de: FEMS Microbiology Reviews, 27/3, Andrews, S.C., Robinson, A.K, Rodriguez-Quinones, Bacterial iron homeostasis, 215-237, Copyright 2003).

Em *S. saprophyticus* ainda não há descrição de como ocorre a regulação da concentração intracelular de ferro. Entretanto, Costa (2016) descreve através de análises *in silico* a presença de genes que codificam proteínas responsáveis pelo metabolismo de ferro em *S. saprophyticus*, demonstrados na tabela 1. É possível identificar que *S. saprophyticus* possui gene codificante para o fator transcricional Fur (ferric uptake regulator) que é responsivo à privação deste metal. Os dados mostrados abaixo foram obtidos em colaboração. O grupo também gerou análises

*in silico*, porém estes dados apenas serão mostrados em posterior artigo. O presente trabalho apresenta apenas a metodologia do estudo para melhor entendimento da tabela 1.

**Tabela 1** – Genes relacionados ao metabolismo de ferro em *S. saprophyticus*, identificados por análises *in silico* de homologia.

| Nome do gene <sup>1</sup> | Nome da proteína <sup>2</sup>  | Gene ID <sup>3</sup> | Espécie referência | Valor de E |
|---------------------------|--|----------------------|--------------------|------------|
| <i>fhuC</i>               | iron (Fe <sup>3+</sup> ) ABC transporter ATP-binding protein                             | 5777465              | <i>S. aureus</i>   | 0          |
| <i>fhuB</i>               | Permease do sistema de transporte ABC de ferricromo                                      | 1123410              | <i>S. aureus</i>   | 5e-05      |
| <i>fhuG</i>               | Permease do sistema de transporte ABC de ferricromo                                      | 1123411              | <i>S. aureus</i>   | -          |
| <i>htsC</i>               | Permease de transporte de grupos heme  | 1122200              | <i>S. aureus</i>   | 1e-165     |
| <i>htsB</i>               | Permease de transporte de grupos heme  | 1122201              | <i>S. aureus</i>   | 3e-172     |
| <i>htsA</i>               | Lipoproteína de transporte de grupos heme  | 1122202              | <i>S. aureus</i>   | 0          |
| <i>sfaC</i>               | Proteína hipotética  | 5331271              | <i>S. aureus</i>   | 4e-108     |
| <i>sfaB</i>               | Proteína hipotética  | 5331272              | <i>S. aureus</i>   | 0          |
| <i>sfaA</i>               | Proteína hipotética  | 5331273              | <i>S. aureus</i>   | 0          |
| <i>sfaD</i>               | Proteína hipotética  | 5331274              | <i>S. aureus</i>   | 2e-171     |
| <i>sstA</i>               | Proteína transportadora FecCD  | 2859509              | <i>S. aureus</i>   | 0          |
| <i>sstB</i>               | Proteína transportadora FecCD  | 2859510              | <i>S. aureus</i>   | 3e-146     |
| <i>sstC</i>               | Transportador ABC, proteína de ligação à ATP   | 2859511              | <i>S. aureus</i>   | 3e-102     |
| <i>opp1F</i>              | Transportador de oligopeptídeos, subunidade ATPase                                       | 3793637              | <i>S. aureus</i>   | 2e-104     |
| <i>opp1D</i>              | Transportador de oligopeptídeos, subunidade ATPase                                       | 3793636              | <i>S. aureus</i>   | 4e-106     |
| <i>opp1C</i>              | Transportador de oligopeptídeos, subunidade ATPase                                       | 3793635              | <i>S. aureus</i>   | 2e-162     |
| <i>opp1B</i>              | Transportador de oligopeptídeos, subunidade ATPase                                       | 3793634              | <i>S. aureus</i>   | 0.0        |
| <i>opp1A</i>              | Transportador de oligopeptídeos, subunidade ATPase                                       | 5332219,             | <i>S. aureus</i>   | 0.0        |
| <i>yfmD</i>               | Permease do sistema de importe Fe <sup>3+</sup> -citrato YfmD                            | 936110               | <i>B. subtilis</i> | 1e-13      |
| <i>fhuC</i>               | Proteína de ligação ao ATP do sistema de importe de ferro <sup>3+</sup> hidroxamato FhuD | 935994               | <i>B. subtilis</i> | 4e-12      |

<sup>1</sup> Nome do gene adotado para a espécie de referência;

<sup>2</sup> Anotação do gene de acordo com dados fornecidos pelo banco de dados NCBI;

<sup>3</sup> Número de acesso do genoma de *S. epidermidis* utilizado para busca de ortólogos;

Em *S. aureus*, também descrito por Costa (2016) foram identificados dois transportadores ABC que permitem essa internalização, e são codificados por *fhuBCDG* e *sstABCD*, podendo ser observado que esses genes possuem ortólogos em *S. saprophyticus*, que codificam importadores de sideróforos do tipo catecóis. Também foram encontrados genes ortólogos à genes responsáveis por importar sideróforos do tipo hidroxamato em *S. saprophyticus*, apesar de maquinaria gênica para produção de hidroxamatos e catecóis não existir em *S. saprophyticus*.

## 2.0 – JUSTIFICATIVA

Em ambientes aeróbios e de pH neutro ou básico, o ferro, na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), está predominantemente insolúvel e precisa ser complexado e solubilizado para captação. Bactérias patogênicas encontram o ferro complexado com ácidos orgânicos ou proteínas do hospedeiro (Andrews *et al* 2003; Dimkpa *et al.* 2008; Hood & Skaar 2012). Em pH ácido o ferro está predominantemente em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) solúvel.

A forma mais eficiente para captação de ferro extracelular encontrada por bactérias se dá através da síntese de sideróforos (Miethke & Marahiel 2007). Existem poucos trabalhos que abordam o ferro como fator de virulência em *S. saprophyticus*, no gênero, a bactéria mais estudada é *S. aureus* a qual já se sabe que produz seus próprios sideróforos, porém é coagulase positiva (Higashide *et al.* 2008). Uma abordagem mais profunda sobre as vias reguladas pelo ferro em *S. saprophyticus* abre perspectivas para entender mais sobre outras bactérias do gênero que são coagulase negativas.

Diante do exposto é possível perceber a importância de estudos relacionados à adaptação de *S. saprophyticus* às variações de pH e à eficiência na regulação do metabolismo de ferro, tendo em vista que contribuirão para entender outros mecanismos de virulência ainda não descrito neste modelo de estudo.

### 3.0 - OBJETIVOS

O objetivo geral é elucidar se *S. saprophyticus* modula proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro em função de variações de pH e estudar a produção/utilização de produção de sideróforos em *S. saprophyticus*.

Objetivos específicos:

- Avaliar a resposta proteômica de *S. saprophyticus* em condições de cultivo ácida e básica;
- Avaliar se o metabolismo de ferro é regulado por diferenças de pH;
- Avaliar se *S. saprophyticus* produz sideróforos em meio de cultura quimicamente definido, com e sem ferro;
- Identificar o tipo de sideróforo produzido, caso haja produção do mesmo;
- Avaliar se a privação de ferro por *S. saprophyticus* influencia a sobrevivência deste microrganismo durante ensaio de infecção *ex vivo* em macrófagos eternizados.

## **4.0 – METODOLOGIA**

### **4.1 - Cultivo e manutenção de *S. saprophyticus***

A cepa de *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 foi a utilizada para os estudos. A cepa é estocada em meio BHI adicionado de 20% de glicerol a -80°C. Os experimentos foram realizados em meio BHI (Difco) líquido a 36 °C, com agitação. Para isso, colônia isolada de *S. saprophyticus* é inoculada no meio de cultura por 18 horas. Para experimentos em privação de ferro foi utilizado o meio SSD “Staphylococcal siderophore detection” (Lindsay and Riley 1994) com 2% de ferro por 16-18 horas a 37°C a 150rpm. As curvas de crescimento em presença e ausência de ferro foram realizadas em meio SSD com as seguintes concentrações de ferro: 0, 0.1, 0.5, 1, 5 e 10 µg/µL.

### **4.2 - Curva de crescimento de *S. saprophyticus* em pHs ácido, neutro e alcalino e curva de crescimento em meio SSD da presença e ausência de ferro**

Para a curva de crescimento de *S. saprophyticus* em diferentes pHs, uma colônia foi pré-inoculada em meio BHI por 16-18 horas a 37°C a 150rpm. Em seguida, um inóculo de 0,5% foi utilizado em meio BHI em pHs 5,5; 7 e 9 e incubados a 37°C a 150 rpm e a D.O.<sub>600</sub> foi monitorada a cada hora durante 8 horas em aparelho espectrofotômetro (Thermo Scientific). O experimento foi realizado em triplicata em placa de 96 poços.

Para a curva de crescimento de *S. saprophyticus* em meio SSD na presença e ausência de ferro, uma colônia foi pré-inoculada em meio SSD “Staphylococcal siderophore detection” (Lindsay and Riley 1994) com 2mM de ferro e incubada por 16-18 horas a 37°C a 150rpm. Em seguida, foi feito um inóculo utilizando de 0,5% do pré inóculo lavado com SSD sem ferro. Após isso, as bactérias foram transferidas para o meio SSD com as devidas concentrações de ferro estabelecidas para a curva: 0, 0.1, 0.5, 1, 5 e 10 µg/µL e incubados a 37°C a 150 rpm e a DO<sub>600</sub> foi monitorada a cada duas horas por 72 horas em aparelho espectrofotômetro (Thermo Scientific). O experimento foi realizado em triplicata em placa de 96 poços.

### **4.3- Extração de proteínas totais de *S. saprophyticus***

Para a obtenção do extrato, as células obtidas após cultivo foram centrifugadas e adicionadas em tubo de extração de 2 ml com perolas de vidro (Sigma Aldrich) de 0,2 a 0,8 mm juntamente a tampão de extração contendo 20 mM

de Tris (Fisher Scientific) e 2 mM de cálcio (Sigma Aldrich). As células foram lisadas em aparelho de agitação Bead Beater (Biospec) em quatro ciclos de 30 segundos. Após a análise celular, o extrato proteico foi obtido por centrifugação dos restos celulares a 14.000 rpm por 15 minutos. As amostras foram dosadas com reagente de Bradford (Sigma Aldrich) em aparelho de ELISA (Thermo Scientific) e em seguida concentrado em dispositivo amicon (Millipore) de 3 kDa para obtenção da concentração mínima de 1 µg/µL de extrato protéico. A integridade do extrato protéico obtido foi avaliada em gel SDS-PAGE contendo 30 µg de extrato de cada condição avaliada.

#### **4.4- Preparação das amostras para espectrometria de massas**

Um total de 150 µg de extrato protéico de cada condição avaliada foi utilizado para identificação por espectrometria de massas. As amostras foram tratadas com DTT 10mM (GE Healthcare) por 30 min para redução e 30min com iodoacetamida 10mM (Sigma-Aldrich) para alquilação. Após este tratamento, as proteínas foram incubadas com 20 ng de tripsina (Promega) por 16h a 37 °C para digestão. Os peptídeos obtidos foram tratados com ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% (Sigma-Aldrich) e purificadas com resina de C18 ZipTips (Millipore). As resinas foram equilibradas antes do uso com 30 µL de acetonitrila (ACN), seguida de lavagem com 30 µL das seguintes soluções: (1) ACN 80% e TFA 0.1%, (2) ACN 50% e TFA 0.1%, (3) ACN 30% e TFA 0.1% e, por último (4) TFA 0.1%. Os peptídeos foram ligados às ZipTips por 10 pipetagem consecutivas de 10 µL de amostra. Após a ligação dos peptídeos na resina, as impurezas foram retiradas por lavagens com 50 µL de TFA 0.1% e os peptídeos eluídos com 20 µL de ACN 50% e TFA 0.1%, seguida de uma eluição com 20 µL de ACN 80% com TFA 0.1%. Os dois eluatos foram combinados para concentração usando centrífuga de vácuo (Eppendorf).

#### **4.5 - Espectrometria de massas para identificação de proteínas de *S. saprophyticus***

As amostras foram analisadas após separação por nano cromatografia líquida (LC) Nano Acquity UPLC (Waters®) por espectrômetro de massas com fonte nano eletrospray (ESI) MS/MS pela aplicação de 1,5 kV e volume de vazão de 1 µL/min em aparelho SYNAPT Q-TOF (Waters®). A análise de homologia foi

realizada em bancos de dados utilizando o software ProteinLynx 2.3 com base em banco de dados (Waters®).

#### **4.6 - Análise *in silico* de genes codificantes para proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro em *S. saprophyticus***

Foi realizada busca em banco de dados genômico de *S. saprophyticus* para proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro, por homologia com proteínas já identificadas em outras espécies do gênero *Staphylococcus*. As buscas foram realizadas para presença de ferro redutases, proteínas relacionadas à síntese e captação de sideróforos e xenosideróforos e proteínas ligantes de ferro. As buscas foram realizadas em banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dados presentes apenas no artigo.

#### **4.7 - Ensaio de detecção de sideróforos de *S. saprophyticus***

O ensaio de detecção de sideróforos foi realizado por ensaio de CAS (chrome azurol sulfonate), conforme protocolo já padronizado por nosso grupo de pesquisa (Silva-Bailão *et al.* 2014) Soluções estoque foram preparadas: HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) (Fisher Scientific) 10 mM, solução de FeCl<sub>3</sub> X 6H<sub>2</sub>O 1 mM (Sigma Aldrich) em HCl 10 mM, CAS 2 mM (Sigma Aldrich) e ácido sulfosalicílico 0,2 M (Fisher Scientific). A solução do ensaio de CAS foi preparada adicionando 6 mL de HDTMA, 1,5 mL de solução de ferro e 7,5 mL de solução CAS. Em outro frasco, foi adicionado 4,3 g de piperazine (PIPES) (Sigma Aldrich) em água e 6,25 mL de HCl 12 M. Este tampão foi adicionado ao primeiro frasco contendo a solução CAS e o volume completado com água ultrapura.

Para determinar a presença e concentração de sideróforos, foi adicionado 500 µL de sobrenadante de cultura (previamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos) e 500 µL da solução preparada anteriormente (a). A amostra referência (r) é feita com meio de cultura estéril. Então, 20 µL de ácido sulfosalicílico 0,2 M (concentração final de 4 mM) foi adicionado em todas as amostras. A absorbância no comprimento de onda de 630 nm foi medida em espectrofotômetro após 30 minutos. A concentração de sideróforos foi determinada com base no seguinte cálculo:  $[(Ar) Aa/Ar].100 = \% \text{ de unidades de sideróforos presente no meio}$  (Machuca & Milagres 2003)

#### **4.8 – Extração de sideróforos com metanol**

Para preparar sobrenadantes concentrados em sideróforos produzidos pela bactéria, cepas de *S. saprophyticus* foram cultivados com aeração em meio SSD com total privação de ferro. Durante 48 horas a 37 ° C. As células foram removidas por centrifugação e os sobrenadantes foram liofilizados. O sobrenadante seco foi ressuspensionado com metanol (um quinto do sobrenadante original volume), passou pelo papel de filtro Whatman N<sup>o</sup>.1 para remover material insolúvel e foi evaporado rotativamente em speed vacuum. O material foi solubilizado em água a 5% do sobrenadante original volume. -(Beasley *et al.* 2009)

#### **4.9 – Ensaio para classificação do sideróforo do tipo Carboxilato**

Teste espectrofotométrico (Shenker *et al.* 1992) Para 1 ml de filtrado de cultura de teste (SSD crescido com a bactéria e centrifugado), adicionou-se 1 ml de CuSO<sub>4</sub> 250 AM e 2 ml de tampão de acetato a pH 4. O complexo de cobre formado foi observado para máxima absorção entre 190 e 280 nm. Não há comprimento de onda específico no qual o complexo de cobre é absorvido. Todo o comprimento de onda de 205 a 280 nm foram escaneados para observar o pico de absorção de sideróforos.

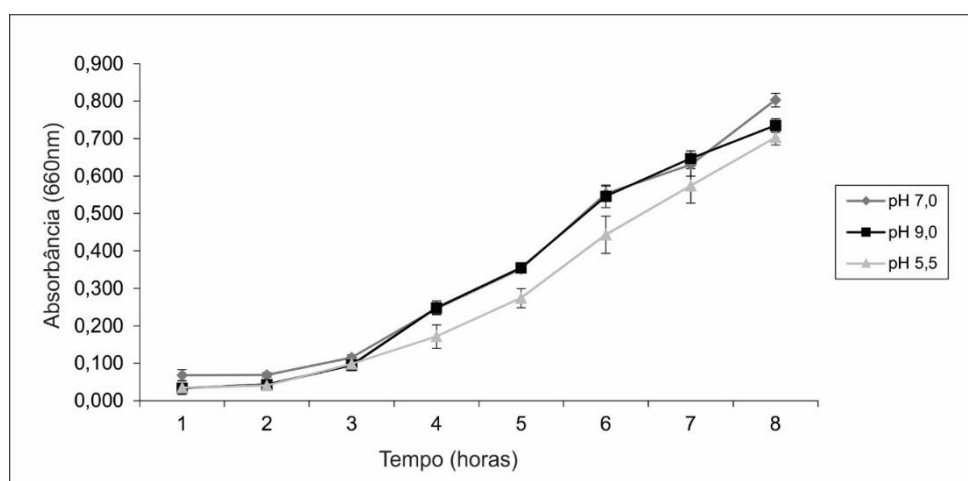
#### **4.10 - Ensaio de fagocitose de *S. saprophyticus* por macrófagos eternizados após privação de ferro**

As 3 cepas de *S. saprophyticus* foram incubadas em meio SSD (Lindsay & Riley 1994) com e sem ferro por 18 horas, 36° C, sob agitação. Estas células foram lavadas com meio RPMI e utilizadas para ensaio de fagocitose em macrófagos, para avaliar o efeito da depleção de ferro na sobrevivência de *S. saprophyticus* durante fagocitose. Macrófagos eternizados linhagem J774 cultivados em meio RPMI e previamente ativados com interferon gama por 24 horas foram utilizados para infecção com células de *S. saprophyticus* cultivadas previamente em meio privado de ferro por 48 horas e não privado de ferro (controle). Foi utilizada uma proporção de 50 células bacterianas para cada macrófago. Após 2 horas os macrófagos foram lisados e as bactérias internalizadas, recuperadas e plaqueadas em meio BHI com novobiocina para contagem de unidade formadora de colônias (UFC).

## 5.0 - RESULTADOS OBTIDOS -

### 5.1 - Avaliação do crescimento de *S. saprophyticus* em pHs 5,5; 7 e 9

O crescimento de células de *S. saprophyticus* em pH ácido, neutro e alcalino, foi avaliado através de uma curva de crescimento das células durante 8 horas nos pHs de 5,5, 7,0 e 9,0. O resultado é mostrado na Figura 2. Não foi observada diferença de crescimento das células durante as 3 primeiras horas de incubação nos pHs avaliados. No entanto, observou-se uma discreta redução na taxa de crescimento celular de *S. saprophyticus* em pH 5,5 após 4 horas, mantida até 8 horas. A fim de assegurar a mesma quantidade de células, foi utilizado o tempo de 3 horas para avaliar a resposta proteômica de *S. saprophyticus* em pH ácido e alcalino.



**Figura 2- Curva de crescimento celular de *S. saprophyticus* em pHs 5,5, 7,0 e 9,0.** O experimento foi realizado em meio BHI em triplicata em placa de 96 poços. A absorbância foi obtida em equipamento de espectrofotometria utilizando 660 nm de comprimento de onda.

Extratos protéicos foram obtidos após 3 horas de incubação de *S. saprophyticus* em meios BHI nos pHs 5,5; 7 e 9 para garantir a mesma quantidade de células em todos os pHs. Os extratos protéicos foram tripsinizados e submetidos a nano UPLC MS<sup>E</sup>. As proteínas foram identificadas por homologia em banco de dados e os resultados obtidos nos pHs 5,5 e 9 foram comparados aos dados obtidos de proteínas identificadas em *S. saprophyticus* após cultivo em pH 7. Proteínas que apresentaram uma diferença de expressão de 35% em relação ao pH 7 foram consideradas reguladas (positiva ou negativamente) em resposta ao pH.

## 5.2 – Regulação de proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro de *S. saprophyticus* em resposta aos estresses ácido e alcalino.

Avaliamos uma regulação de proteínas relacionada ao metabolismo do ferro durante a incubação ácida e alcalina. Proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro de *S. saprophyticus* reguladas durante a incubação em pH ácido e alcalino são mostrados na Tabela 2.

Durante a incubação de *S. saprophyticus* em pH ácido (em que a disponibilidade de ferro solúvel é maior), *S. Saprophyticus* promove a regulação negativa do armazenamento de ferro pela redução da produção de ferritina (FtnA). Em *S. aureus*, FtnA está localizada na membrana de vacúolos e promove o armazenamento e mobilização de ferro (Brady *et al.* 2006). Além disso, a proteína citrato sintase (GltA) é regulada negativamente, conforme esperado, tendo em vista que o citrato é substrato para a produção de sideróforos do tipo carboxilato e a disponibilidade de ferro reprime a produção de sideróforos (Sheldon & Heinrichs 2015). É possível detectar também a regulação positiva da proteína catalase, que possui ferro em seu centro catalítico. A regulação positiva da catalase pode ocorrer em função da disponibilidade deste micronutriente para síntese da proteína. Foi possível detectar ainda a regulação negativa das proteínas deaminase porfobilinogênio que atua na síntese de heme, utilizado para garantir estoques intracelulares de ferro. Curiosamente, a enzima lipoil sintase foi regulada negativamente nas condições de pH ácido e básico (quando comparadas à situação controle, com pH neutro), provavelmente por motivos diferentes, discutidos posteriormente.

Por outro lado, o pH alcalino promove uma regulação positiva da proteína de ligação e transportador de ferricromo ABC em *S. saprophyticus*. Em *S. aureus*, este sistema de xenosideróforos é internalizado na tentativa de adquirir ferro (Sheldon and Heinrichs 2015). Duas flavohemoproteínas de dioxigenase de nitrogênio e montagem de Fe-S ATPase SufC foram reguladas negativamente em função de menor disponibilidade de ferro, uma vez que flavohemoproteínas dependem do ferro a ser sintetizado e o SufC requer ferro para sintetizar grupamentos ferro-enxofre. Da mesma forma, uma ferrochelatase (HemH) é regulada negativamente durante a incubação de *S. saprophyticus* em pH 9, uma vez que o ferro é predominantemente insolúvel em pH alcalino.

**Tabela 2** - Proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro e proteínas ferro dependentes com expressão reguladas nas condições ácida e básica.

| Número de acesso <sup>1</sup>         | Descrição da proteína <sup>2</sup>   | Expressão relativa <sup>3</sup> |
|---------------------------------------|--|---------------------------------|
| <b>pH 5,5 Reguladas positivamente</b> |  |                                 |
| CATA                                  | Catalase   | 1,42                            |
| <b>pH 5,5 Reguladas negativamente</b> |  |                                 |
| Y2125                                 | Putativa peroxidase heme-dependente  | 0,69                            |
| FTN                                   | Ferritina  | 0,59                            |
| LIPA                                  | Lipoil sintase   | 0,65                            |
| Q49YC5                                | Citrato sintase  | 0,25                            |
| HEM3                                  | Deaminase porfobilinogênio   | 0,65                            |
| <b>pH 9,0 Reguladas positivamente</b> |  |                                 |
| Q49ZK8                                | Putativa ABC tipo cobalamina Fe <sup>3</sup> sistema sideroforo detransporte | *                               |
| <b>pH 9,0 Reguladas negativamente</b> |  |                                 |
| LIPA                                  | Lipoil sintase   | 0,66                            |
| HEMH                                  | Ferroquelatase   | 0,66                            |
| SODM                                  | Superoxido dismutase Mn Fe   | 0,57                            |
| Q49UL6                                | Flavohemoproteína  | 0,53                            |
| Q49WI6                                | Putativa flavohemoproteína   | 0,57                            |
| Q49W53                                | Putativa regulador de ferro transportador ABC                                | 0,70                            |

1- Número de acesso da proteína no banco de dados UNIPROT;

2- Descrição da proteína de acordo com dados UNIPROT;

3- Expressão da proteína em relação à condição controle (pH7). Modulação da expressão em 35% foi considerada significativa (valores  $\leq 0,74$  e  $\geq 1,35$ ).

\* Proteínas não identificada na condição controle.

As proteínas que foram reguladas negativamente e positivamente tanto nos pHs ácido como básico (Tabela 2) apresentam sua função regulada pela disponibilidade de ferro ou regulam a captação/utilização deste micronutriente. Uma delas é a Catalase que é regulada positivamente em pH ácido, é uma proteína que tem seus centros catalíticos compostos por ferro heme, e depende do ferro para realizar reações para catalizar a decomposição de moléculas de peróxido de hidrogênio (Chelikani *et al* 2004).

Durante a incubação de *S. saprophyticus* em pH ácido, *S. Saprophyticus* promove a regulação negativa do armazenamento de ferro pela redução da produção de ferritina (FtnA). Em *S. aureus*, FtnA está localizada na membrana de vacúolos e promove o armazenamento e mobilização de ferro (Brady *et al.* 2006). Além disso, a proteína citrato sintase (GltA) é regulada negativamente, conforme esperado. O citrato é substrato para a produção de sideróforos do tipo carboxilato e a disponibilidade de ferro reprime a produção de sideróforos (Sheldon & Heinrichs 2015).

A regulação negativa de lipoil sintase em pH ácido provavelmente não está correlacionada com o metabolismo de ferro. O lipoil é cofator para várias enzimas do metabolismo energético, tais como subunidades da piruvato desidrogenase e a enzima diidrolipoil succiniltransferase (participante do ciclo do ácido tricarboxílico). O lipoil também pode ser carregado pela proteína H do sistema de clivagem de glicina (Cronan *et al* 2005) As análises proteômicas das proteínas reguladas negativamente em *S. saprophyticus* durante incubação em pH ácido (Tabela suplementar 2) demonstram que tanto o metabolismo energético (glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico) estão regulados negativamente, assim como o sistema de clivagem de glicina (incluindo a proteína H). Desta forma, a regulação negativa de lipoil sintase nesta condição ocorre provavelmente em função da célula requerer menos lipoil para manutenção do metabolismo. Já a regulação negativa de lipoil sintase em *S. saprophyticus* após cultivo em pH alcalino parece estar relacionado com a carência de ferro solúvel nesta condição. A lipoil sintase de *Escherichia coli* apresenta dois grupamentos Fe-S (Cicchillo *et al.* 2004) e a regulação negativa de lipoil sintase em *S. saprophyticus* durante incubação em pH alcalino provavelmente ocorreu em função da baixa disponibilidade de ferro nesta condição, que impede a síntese de novos grupamentos Fe-S, bem como aumenta a degradação dos grupamentos Fe-S existentes na célula.

Como o metabolismo energético está regulado negativamente nesta condição (Tabela suplementar 2) a utilização de lipoil é reduzida, levando à regulação negativa da enzima que sintetiza esta molécula. Entretanto, a regulação negativa não seja necessário, tendo em vista que as vias que utilizam lipoil estejam reguladas negativamente (por exemplo, ciclo do ácido tricarboxílico) atuar na síntese de lipoil utilizando os grupamentos Fe-S da própria enzima, mas ser dependente de ferro (McCarthy & Booker 2017).

Por outro lado, o pH ácido promove uma regulação positiva da proteína de ligação e transportador de ferricromo ABC em *S. saprophyticus*. Em *S. aureus*, este sistema de xenosideróforos é internalizado na tentativa de adquirir ferro (Sheldon & Heinrichs 2015). Duas flavohemoproteínas de dioxigenase de nitrogênio e montagem do cluster Fe-S (lipoil sintase ATPase e SufC) foram reguladas negativamente em função de menor disponibilidade de ferro, uma vez que flavohemoproteínas dependem do ferro a ser sintetizado e o SufC requer ferro para sintetizar grupamentos ferro-enxofre. Da mesma forma, uma ferrochelatase

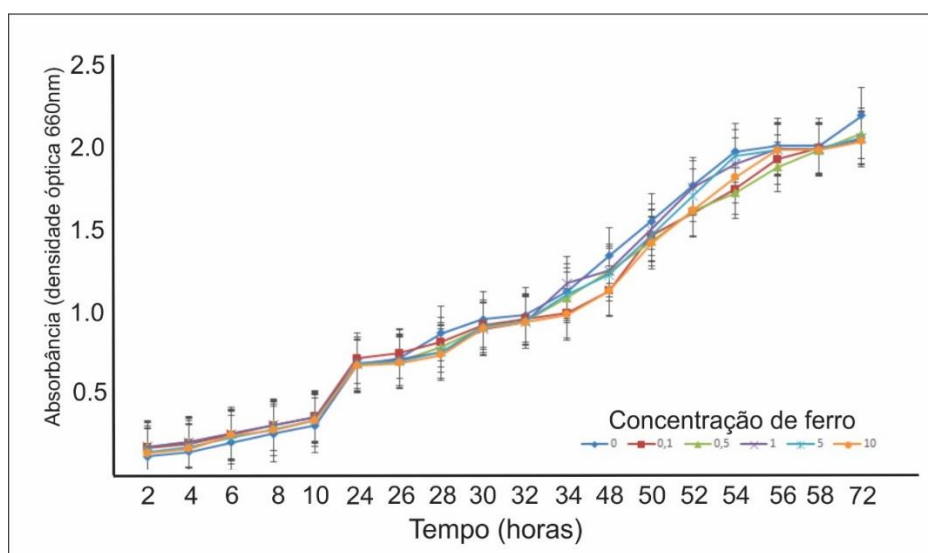
(HemH) é regulada negativamente durante a incubação de *S. saprophyticus* em pH 9, uma vez que o ferro é predominantemente insolúvel em pH alcalino.

Superoxido dismutase (SOD) Mn Fe, tem sítios ativos para manganês e ferro (LAH *et al.*; 1995) As SODs são metaloenzimas que usam um metal redox-ativo para desproporcionar duas moléculas de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo que o último é removido por catalase e enzimas peroxidase (Sheng *et al.* 2014). A proteína deaminase porfobilinogênio foi encontrada regulada negativamente em pH alcalino pode se ligar a ferro heme, é uma enzima que catalisa a formação de hidroximetilbilanos, um intermediário de tetrapirrole, durante a biossíntese de heme através da polimerização gradual de quatro moléculas de (Uchida *et al.* 2018).Essas proteínas são induzidas negativamente em pH 9,0, já que o ferro existente no meio se torna indisponível nessa condição.

### **5.3 – Avaliação da capacidade de crescimento celular de *S. saprophyticus* em concentrações variadas de ferro**

Durante os estudos, surgiu a necessidade de saber como seria o crescimento da bactéria em diferentes concentrações de ferro, e se havia uma concentração de ferro tóxica, então foi feita uma curva de crescimento nas concentrações de 0,0 até 10mM de ferro, figura 3. Lindsay e Riley, 1994, fizeram também essa curva de crescimento para *S. aureus* por 40 horas , e foi observado o melhor crescimento da bactéria no meio contendo 0,5uM de ferro, sendo que após 10uM houve um crescimento muito lento, e após essa concentração de ferro o bactéria deixou de crescer.

Para o desenho da curva cada cepa foi crescida em meio BHI sólido, depois uma colônia foi transferida para meio SSD com 2 mM de ferro (pré inóculo). Após 18 horas, o pré inóculo foi centrifugado para baixar as células à 2500 rpm, e as células foram lavadas com meio SSD sem ferro e transferidas para meio SSD sem ferro e distribuídas em placa de 96 poços em triplicatas para cada concentração de ferro.



**Figura 3** – Curva de crescimento em meio SSD sem ferro e nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mM de ferro da cepa ATCC15305 da bactéria *Staphylococcus saprophyticus*.

Foi possível observar que apesar da ausência do ferro as bactérias conseguiram crescer, mesmo que lentamente, durante 72 horas. Apesar da alta concentração de ferro (10mM) as bactérias cresceram, sugerindo que *S. saprophyticus* possui sistema de regulação da concentração de ferro intracelular e de captação deste micronutriente, o que também é sugerido pelas análises *in silico*. Cada cepa apresenta um padrão de crescimento diferente nas diferentes concentrações de ferro, porém todas elas formam uma curva crescente.

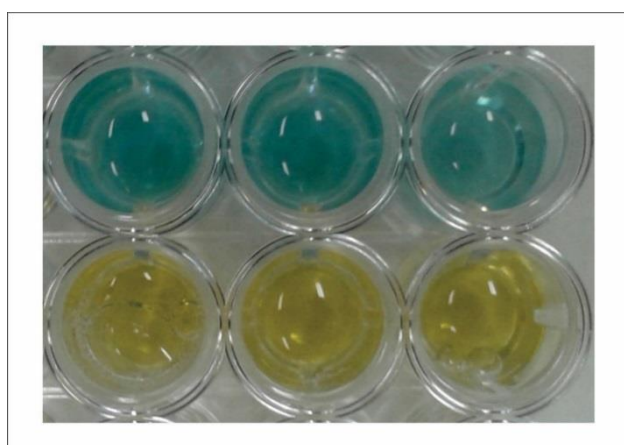
#### 5.4 – Avaliação da produção de sideróforos por *S. saprophyticus*

Após o desenho da curva de crescimento, foi visto que a bactéria tem potencial para crescer em meio sem ferro. Sendo assim, utilizando meio CAS (cromo azurol S) líquido, foi possível detectar que *S. saprophyticus* é capaz de produzir sideróforos (Figura 4). E de acordo com a absorbância do meio CAS contendo meio de crescimento da bactéria liofilizado (contendo os sideróforos). A concentração de sideróforos foi determinada com base no seguinte cálculo:  $[(Ar) / As / Ar] \cdot 100 = \% \text{ de unidades de sideróforos presente no meio}$  (Machuca & Milagres 2003)(Figura 5). Análises *in silico* prévias (Tabela 1) demonstram que a bactéria possui densa maquinaria gênica para aquisição e metabolismo de ferro, sendo capaz de produzir seus próprios sideróforos.

*Staphylococcus aureus* produz dois sideróforos de tipo policarboxilato estruturalmente caracterizados chamado estafiloferrina A e estafiloferina (Haag et al. 1994; Drechsel et al. 1993). Foi feito o teste CAS para confirmação de que o

sideróforo produzido por *Staphylococcus saprophyticus* é do tipo carboxilato, figura 4, e em sequência foi calculada a porcentagem de sideróforos produzidos por *S. saprophyticus* cultivado na presença e ausência de ferro, figura 5, que comprova a produção dessa molécula.

Os sideróforos variam muito em estrutura e não existe um procedimento único para determinar sua identificação e produção entre os microrganismos. Podem-se utilizar métodos químicos, microbiológicos e moleculares para a detecção e caracterização dessas moléculas. Entretanto, o método mais amplamente empregado é a utilização de CAS em meio de cultura ou líquido (Neilands 1995). O complexo ternário CAS, formado por cromo azurol S, ferro III e brometo de hexadecil trimetil amônio, constitui-se em um corante de coloração azulada. Na presença de CAS adicionado a um meio de cultura adequado, bactérias que produzam fortes quelantes (sideróforos) são capazes de se multiplicar devido à remoção do ferro complexado ao corante. O processo de transferência é verificado através da mudança de coloração do meio, observada pela mudança da cor do meio de azul para amarelo. A adição do complexo CAS ao meio de cultura é um método eficiente, uma vez que somente sob a produção de sideróforos, o íon férrico poderá ser utilizado pela bactéria (Neilands 1995; LeVier & Guerinot 1996). Lindsay e Riley, 1994, também fizeram o ensaio CAS em que comprovaram a produção de sideróforos por *S. aureus* através da mudança da coloração do meio, de azul para amarelo/alaranjado.



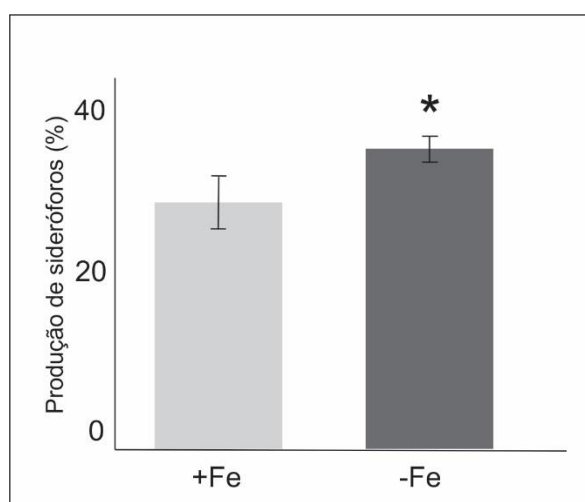
**Figura 4**– Ensaio CAS para detecção de sideróforos.

O método de detecção mais comum para produção de sideroforos é o ensaio universal de Schwyn e Neilands (1987). Este ensaio baseia-se numa competição de ferro entre o complexo férrico do corante cromo azurol S (CAS) e um sideróforo.

O teste CAS pode ser aplicado como um teste de líquido ou alternativamente, o corante pode ser incorporado no meio de ágar para detecção de sideróforo em meio sólido. O teste CAS de sobrenadantes líquidos de culturas foi declarado como sendo quantitativo, no entanto, no meio sólido, não é possível quantificar a reação CAS (Schwyn & Neilands 1987).

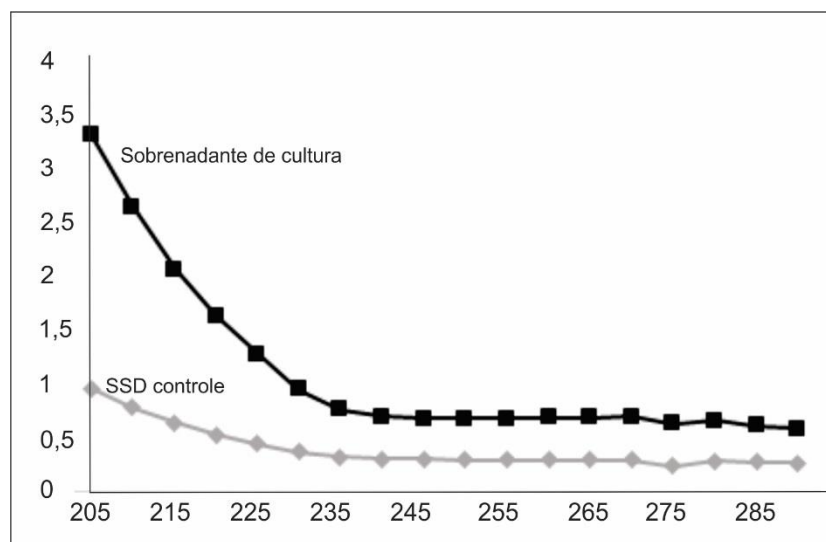
Foi feito o teste Cas líquido que constatou a presença de sideróforos que poderiam ser do tipo hidroxamato ou carboxilato pois para os catecolatos a solução muda para uma cor avermelhada (figura 4). Porém, pelas análises *in silico*, sabíamos que a bactéria não possui maquinaria para produzir hidroxamatos, apenas carboxilatos, apesar de apresentar maquinaria para a aquisição de xenosideróforos do tipo hidroxamto.

Utilizamos o mesmo teste Cas para quantificar, em comparação ao meio SSD sem limpo (onde não foram crescidas bactérias) e o meio de crescimento das bactérias sem ferro, quanto sideróforo foi produzido em 48 horas (Figura 4).



**Figura 5**– Produção de sideróforos pela bactéria *Staphylococcus Saprophyticus* durante 48 horas de incubação em meio SSD sem ferro e com 7 $\mu$ M de ferro. O asterisco denota significância estatística utilizando teste t de Student (p valor  $\leq$  0,05).

Foi feito um teste t de Student para confirmar a relevância dessa diferença apresentada entre o controle e a amostra. O teste t teve como resultado 0,04490192 e o p-valor estabelecido era de 0,5 o que prova a relevância do estudo acima.

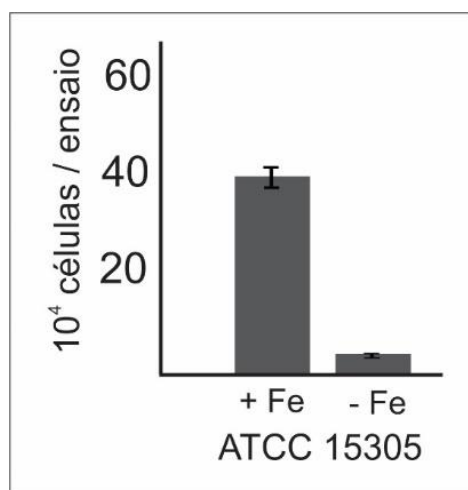


**Figura 6** – Teste de Shenker de detecção de sideróforo. O sobrenadante de cultura de *S. saprophyticus* em meio SSD sem ferro foi liofilizado e os sideróforos foram extraído com metanol. O controle foi realizado com meio SSD sem ferro esterilizado, nas mesmas condições.

Também foi feito um teste confirmatório para o tipo de sideróforo: o Teste espectrofotométrico de Shenker, em que foi constatado um pico antes nas densidades ópticas lidar dentro do comprimento de onda de 205nm até 290nm (Figura 6) o que comprova que realmente o sideróforo produzido por *Staphylococcus saprophyticus* é do tipo carboxilato.

### 5.5 – Ensaio de sobrevivência em macrófagos

O ensaio de sobrevivência da bactéria à fagocitose após a mesma atingir uma D.O. (densidade óptica) de 0,3 nm foi feito com a cepa ATCC 15305 e foi observado que durante a privação de ferro a bactéria se torna menos resistente à fagocitose, e na presença do micronutriente é mais resistente (Figura 7).



**Figura 7** - Contagem de colônias recuperadas após a fagocitose dos macrófagos durante duas horas.

A vulnerabilidade da célula bacteriana à fagocitose na ausência do micronutriente ferro pode ser explicada pelo fato de que o ferro é um micronutriente essencial para a constituição de citocromos e proteínas ferro enxofre (transportadores de elétrons), e é também cofator de enzimas.

O ferro normalmente é utilizado como grupo prostético ou cofator de proteínas envolvidas em funções como síntese de aminoácidos, fixação de nitrogênio, ciclo do ácido cítrico, síntese de aminoácidos, resistência a estresse redox e transporte de oxigênio. O ferro também é utilizado por proteínas transportadoras de elétrons envolvidas em processos de respiração celular e captação de luz (Braun and Hantke 2011; Andrews *et al* 2003). O ferro é de extrema importância para as bactérias, sendo que apenas algumas bactérias do gênero dos *Lactobacillus*, juntamente com *Borrelia burgdorferi*, já foram apontadas como capazes de se desenvolver e multiplicar em ambiente livre de ferro, utilizando-se de outros metais, como manganês e cobalto, para desempenhar suas funções metabólicas (Andrews *et al* 2003) . O que comprova a suscetibilidade bacteriana à fagocitose.

## 6.0 - CONCLUSÕES

O perfil proteômico de *S. saprophyticus* foi avaliado quando a bactéria foi cultivada em pH ácido e básico, e os resultados dessas análises concluem que *S. saprophyticus* responde às alterações de pH modulando proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro.

Utilizando metodologias para identificação e classificação de sideróforos produzidos por *S. saprophyticus* comprovou-se que a bactéria, além de apresentar potencial proteômico para captação de xenosideróforos presentes em seu meio, também é capaz de produzir seus próprios sideróforos, que são do tipo carboxilato. Este resultado corrobora as análises *in silico* realizadas.

Finalmente, durante ensaios de fagocitose em macrófagos foi possível demonstrar que *S. saprophyticus* é mais suscetível à morte após fagocitose por macrófagos quando previamente privado de ferro, demonstrando que este elemento é importante para garantir a infecção, concluindo assim a importância desse micronutriente para o sucesso da infecção no hospedeiro e sua sobrevivência.

## 7.0 – PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho é o primeiro que trata da caracterização do metabolismo de ferro em *S. saprophyticus*. Neste sentido, abre perspectivas futuras, tais como:

- Quantificar transcritos codificantes para redutases em diferentes tempos de cultura da bactéria na presença e na ausência de ferro por PCR em tempo real quantitativa para avaliar quais as redutases podem atuar na redução do ferro insolúvel para posterior captação do mesmo;
- Estabelecer vias de captação de xenosideróforos e quais tipos de xenosideróforos são sequestrados através de cultivo da bactéria em meio com e sem os xenosideróforos.

## 8.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS –

Andrews, Simon C, Andrea K Robinson, and Francisco Rodríguez-Quiñones. 2003. “Bacterial Iron Homeostasis.” *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2–3): 215–37.

Beasley, Federico C, Enrique D Vinés, Jason C Grigg, Qin Zheng, Suyu Liu, Gilles A Lajoie, Michael E P Murphy, and David E Heinrichs. 2009. “Characterization of Staphyloferrin A Biosynthetic and Transport Mutants in *Staphylococcus Aureus*.” *Molecular Microbiology* 72 (4): 947–63.

Benite, Anna Maria Canavarro, Sérgio De Paula Machado, and Bianca Da Cunha Machado. 2002. “Sideróforos: Uma Resposta Dos Microorganismos.” *Química Nova* 25 (6b): 1155–64.

Bilitewski, Ursula, Joshua A V Blodgett, Anne-Kathrin Duhme-Klair, Sabrina Dallavalle, Sabine Laschat, Anne Routledge, and Rainer Schobert. 2017. “Chemical and Biological Aspects of Nutritional Immunity-Perspectives for New Anti-Infectives That Target Iron Uptake Systems.” *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 56 (46): 14360–82.

Brady, Rebecca A, Jeff G Leid, Anne K Camper, J William Costerton, and Mark E Shirtliff. 2006. “Identification of *Staphylococcus Aureus* Proteins Recognized by the Antibody-Mediated Immune Response to a Biofilm Infection.” *Infection and Immunity* 74 (6): 3415–26.

Braun, Volkmar, and Klaus Hantke. 2011. “Recent Insights into Iron Import by Bacteria.” *Current Opinion in Chemical Biology* 15 (2): 328–34.

Costa, S. C., Parente, A. F. A., Weber, S. S. 2016. Homeostase de ferro e zinco em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa: rastreamento de mecanismos de subversão da imunidade nutricional. Trabalho de Conclusão de Curso. UNIP, Manaus.

Chelikani, P, I Fita, and P C Loewen. 2004. “Diversity of Structures and Properties among Catalases.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 61 (2): 192–208.

Cicchillo, Robert M, Kyung-Hoon Lee, Camelia Baleanu-Gogonea, Natasha M Nesbitt, Carsten Krebs, and Squire J Booker. 2004. “*Escherichia Coli* Lipoyl

Synthase Binds Two Distinct [4Fe-4S] Clusters per Polypeptide.” *Biochemistry* 43 (37): 11770–81.

Cronan, John E, Xin Zhao, and Yanfang Jiang. 2005. “Function, Attachment and Synthesis of Lipoic Acid in *Escherichia Coli*.” *Advances in Microbial Physiology* 50: 103–46.

Crosa, J H. 1997. “Signal Transduction and Transcriptional and Posttranscriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 61 (3): 319–36.

Diarra, M S, J A Dolence, E K Dolence, I Darwish, M J Miller, F Malouin, and M Jacques. 1996. “Growth of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* Is Promoted by Exogenous Hydroxamate and Catechol Siderophores.” *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 853–59.

Dimkpa, Christian O, Ales Svatos, Paulina Dabrowska, Andre Schmidt, Wilhelm Boland, and Erika Kothe. 2008. “Involvement of Siderophores in the Reduction of Metal-Induced Inhibition of Auxin Synthesis in *Streptomyces Spp*.” *Chemosphere* 74 (1): 19–25.

Drechsel, H, S Freund, G Nicholson, H Haag, O Jung, H Zähler, and G Jung. 1993. “Purification and Chemical Characterization of Staphyloferrin B, a Hydrophilic Siderophore from Staphylococci.” *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 6 (3): 185–92.

Dreisbach, Annette, Jan Maarten van Dijk, and Girbe Buist. 2011. “The Cell Surface Proteome of *Staphylococcus Aureus*.” *Proteomics* 11 (15): 3154–68.

Gatermann, S, J John, and R Marre. 1989. “*Staphylococcus Saprophyticus* Urease: Characterization and Contribution to Uropathogenicity in Unobstructed Urinary Tract Infection of Rats.” *Infection and Immunity* 57 (1): 110–16.

Haag, H, H P Fiedler, J Meiwes, H Drechsel, G Jung, and H Zähler. 1994. “Isolation and Biological Characterization of Staphyloferrin B, a Compound with Siderophore Activity from Staphylococci.” *FEMS Microbiology Letters* 115 (2–3): 125–30.

Hantke, K. 2001. “Iron and Metal Regulation in Bacteria.” *Current Opinion in*

*Microbiology* 4 (2): 172–77.

Heikens, E, A Fleer, A Paauw, A Florijn, and A C Fluit. 2005. “Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods for Species-Level Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci.” *Journal of Clinical Microbiology* 43 (5): 2286–90.

Heilberg, Ita Pfeferman, and Nestor Schor. 2003. “Abordagem Diagnóstica E Terapêutica Na Infecção Do Trato Urinário: ITU.” *Revista Da Associação Médica Brasileira* 49 (1): 109–16.

Higashide, Masato, Makoto Kuroda, Carlos Takashi Neves Omura, Miyuki Kumano, Saburo Ohkawa, Sadahiro Ichimura, and Toshiko Ohta. 2008. “Methicillin-Resistant *Staphylococcus Saprophyticus* Isolates Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Have Emerged in Urogenital Tract Infections.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (6): 2061–68.

Hood, M Indriati, and Eric P Skaar. 2012. “Nutritional Immunity: Transition Metals at the Pathogen-Host Interface.” *Nature Reviews. Microbiology* 10 (8): 525–37.

Ipe, Deepak S., Nouri L. Ben Zakour, Matthew J. Sullivan, Scott A. Beatson, Kimberly B. Ulett, William H. Benjamin, Mark R. Davies, et al. 2016. “Discovery and Characterization of Human-Urine Utilization by Asymptomatic-Bacteriuria-Causing *Streptococcus Agalactiae*.” Edited by A. Camilli. *Infection and Immunity* 84 (1): 307–19.

King, Nathan P, Scott A Beatson, Makrina Totsika, Glen C Ulett, Richard A Alm, Paul A Manning, and Mark A Schembri. 2011. “UafB Is a Serine-Rich Repeat Adhesin of *Staphylococcus Saprophyticus* That Mediates Binding to Fibronectin, Fibrinogen and Human Uroepithelial Cells.” *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 4): 1161–75.

King, Nathan P, Türkan Sakinç, Nouri L Ben Zakour, Makrina Totsika, Begoña Heras, Pavla Simerska, Mark Shepherd, Sören G Gatermann, Scott A Beatson, and Mark A Schembri. 2012. “Characterisation of a Cell Wall-Anchored Protein of *Staphylococcus Saprophyticus* Associated with Linoleic Acid Resistance.” *BMC Microbiology* 12 (1): 8.

Kleine, Britta, Sören Gatermann, and Türkan Sakinc. 2010. "Genotypic and Phenotypic Variation among *Staphylococcus Saprophyticus* from Human and Animal Isolates." *BMC Research Notes* 3 (1): 163.

Kuroda, Makoto, Atsushi Yamashita, Hideki Hirakawa, Miyuki Kumano, Kazuya Morikawa, Masato Higashide, Atsushi Maruyama, et al. 2005. "Whole Genome Sequence of *Staphylococcus Saprophyticus* Reveals the Pathogenesis of Uncomplicated Urinary Tract Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (37): 13272–77.

LeVier, K, and M L Guerinot. 1996. "The *Bradyrhizobium Japonicum* fegA Gene Encodes an Iron-Regulated Outer Membrane Protein with Similarity to Hydroxamate-Type Siderophore Receptors." *Journal of Bacteriology* 178 (24): 7265–75.

Lindsay, J A, and T V Riley. 1994. "Staphylococcal Iron Requirements, Siderophore Production, and Iron-Regulated Protein Expression." *Infection and Immunity* 62 (6): 2309–14.

Loes, A N, L Ruyle, M Arvizu, K E Gresko, A L Wilson, and C E Deutch. 2014. "Inhibition of Urease Activity in the Urinary Tract Pathogen *Staphylococcus Saprophyticus*." *Letters in Applied Microbiology* 58 (1): 31–41.

Luong, Thanh T, Shu Ouyang, Kelly Bush, and Chia Y Lee. 2002. "Type 1 Capsule Genes of *Staphylococcus Aureus* Are Carried in a Staphylococcal Cassette Chromosome Genetic Element." *Journal of Bacteriology* 184 (13): 3623–29..

Mabeza, G F, M Loyevsky, V R Gordeuk, and G Weiss. 1999. "Iron Chelation Therapy for Malaria: A Review." *Pharmacology & Therapeutics* 81 (1): 53–75.

Macara, I G, T G Hoy, and P M Harrison. 1973. "The Formation of Ferritin from Apoferritin. Inhibition and Metal Ion-Binding Studies." *The Biochemical Journal* 135 (4): 785–89.

Machuca, A., and A. M.F. Milagres. 2003. "Use of CAS-Agar Plate Modified to Study the Effect of Different Variables on the Siderophore Production by *Aspergillus*." *Letters in Applied Microbiology* 36 (3): 177–81..

Martínez, J L, A Delgado-Iribarren, and F Baquero. 1990. "Mechanisms of Iron Acquisition and Bacterial Virulence." *FEMS Microbiology Reviews* 6 (1): 45–56..

McCarthy, Erin L, and Squire J Booker. 2017. "Destruction and Reformation of an Iron-Sulfur Cluster during Catalysis by Lipoyl Synthase." *Science (New York, N.Y.)* 358 (6361): 373–77.

Medzhitov, Ruslan. 2008. "Origin and Physiological Roles of Inflammation." *Nature* 454 (7203): 428–35..

Miethke, Marcus, and Mohamed A Marahiel. 2007. "Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 71 (3): 413–51.

Moura, Lorena Brandhuber De, and Maiára Gomes Fernandes. 2010. "A Incidência de Infecções Urinárias Causadas Por E . Coli." *Revista Olhar Científico – Faculdades Associadas de Ariquemes* 1 (2): 411–26.

Neilands, J B. 1995. "Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (45): 26723–26.

Oliveira, Andrea Santana de ,Exoproteôma de 3 isolados clínicos de *Staphylococcus saprophyticus* ,2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). UFG, Goiás.

Oppenheimer, S J. 2001. "Iron and Its Relation to Immunity and Infectious Disease." *The Journal of Nutrition* 131 (2S–2): 616S–633S; discussion 633S–635S.

Oppenheimer, S J, F D Gibson, S B Macfarlane, J B Moody, C Harrison, A Spencer, and O Bunari. 1986. "Iron Supplementation Increases Prevalence and Effects of Malaria: Report on Clinical Studies in Papua New Guinea." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (4): 603–12..

Orden-Martínez, Beatriz, Rocío Martínez-Ruiz, and Rosario Millán-Pérez. 2008. "¿Qué Estamos Aprendiendo de *Staphylococcus Saprophyticus*?" *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* 26 (8): 495–99..

Park, Sunny, Kathryn A Kelley, Evgeny Vinogradov, Robert Solinga, Christopher Weidenmaier, Yoshiki Misawa, and Jean C Lee. 2010. "Characterization of the

Structure and Biological Functions of a Capsular Polysaccharide Produced by *Staphylococcus Saprophyticus*.” *Journal of Bacteriology* 192 (18): 4618–26.

Parte, Aidan C. 2014. “LPSN--List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature.” *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D613-6.

Sakinc, Türkan, Magdalena Woznowski, Michael Ebsen, and Sören G Gatermann. 2005. “The Surface-Associated Protein of *Staphylococcus Saprophyticus* Is a Lipase.” *Infection and Immunity* 73 (10): 6419–28.

Schwyn, B, and J B Neilands. 1987. “Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores.” *Analytical Biochemistry* 160 (1): 47–56.

Sheldon, Jessica R, and David E Heinrichs. 2015. “Recent Developments in Understanding the Iron Acquisition Strategies of Gram Positive Pathogens.” *FEMS Microbiology Reviews* 39 (4): 592–630. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv009>.

Sheng, Yuewei, Isabel A Abreu, Diane E Cabelli, Michael J Maroney, Anne-Frances Miller, Miguel Teixeira, and Joan Selverstone Valentine. 2014. “Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases.” *Chemical Reviews* 114 (7): 3854–3918.

Shenker, M., Y. Chen, I. Oliver, M. Helmann, and Y. Hadar. 1992. “Utilization by Tomatoes of Iron Mediated by a Siderophore Produced by *Rhizopus Arrhizus*.” *Journal of Plant Nutrition* 15 (10): 2173–82.

Silva-Bailão, Mirelle Garcia, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão, Beatrix Elisabeth Lechner, Gregory M Gauthier, Herbert Lindner, Alexandre Melo Bailão, Hubertus Haas, and Célia Maria de Almeida Soares. 2014. “Hydroxamate Production as a High Affinity Iron Acquisition Mechanism in *Paracoccidioides Spp*.” *PloS One* 9 (8): e105805.

Uchida, Takeshi, Takumi Funamizu, Minghao Chen, Yoshikazu Tanaka, and Koichiro Ishimori. 2018. “Heme Binding to Porphobilinogen Deaminase from *Vibrio Cholerae* Decelerates the Formation of 1-Hydroxymethylbilane.” *ACS Chemical Biology* 13 (3): 750–60.

Widerström, M, J Wiström, A Sjöstedt, and T Monsen. 2012. “Coagulase-Negative Staphylococci: Update on the Molecular Epidemiology and Clinical Presentation,

with a Focus on *Staphylococcus Epidermidis* and *Staphylococcus Saprophyticus*.”  
*European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official  
Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31 (1): 7–20.

## 9.0 – MATERIAL SUPLEMENTAR

**Table 1 – *S. saprophyticus* up-regulated proteins in response to acid pH treatment.**

| Accession number <sup>1</sup>                      | Protein description   | Score <sup>2</sup> | Fold change <sup>3</sup> | p value <sup>4</sup> |
|--|---|--------------------|--------------------------|----------------------|
| <b>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</b> |   |                    |                          |                      |
| Q49UH6   | Acyl CoA thioesterase   | 3544,73            | *                        | *                    |
| Q49UN6   | Acyl coA synthetase/ligase  | 942,59             | *                        | *                    |
| <b>C compounds metabolism</b>                      |   |                    |                          |                      |
| GLMM   | Phosphoglucosamine mutase   | 1214,62            | *                        | *                    |
| Q4A101   | Alpha acetolactate synthase                                       | 2292,14            | *                        | *                    |
| ALD1   | Putative aldehyde dehydrogenase                                   | 11659,33           | 1,40                     | 0                    |
| <b>Isoprenoid metabolism</b>                       |   |                    |                          |                      |
| IDI2   | Isopentenyl diphosphate delta isomerase                           | 897,94             | *                        | *                    |
| <b>Amino acid metabolism</b>                       |   |                    |                          |                      |
| Q4A0M8   | Putative succinyl diaminopimelate desuccinylase                   | 1871,23            | *                        | *                    |
| <b>Protein synthesis</b>                           |   |                    |                          |                      |
| SYFB   | Phenylalanine tRNA ligase beta subunit                            | 1087,68            | *                        | *                    |
| DLTC   | D alanine poly phosphoribitol ligase                              | 21168,14           | 2,01                     | 0                    |
| SYA  | Alanine tRNA ligase   | 1166,65            | *                        | *                    |
| SYK  | Lysine tRNA ligase  | 889,86             | *                        | *                    |
| SYV  | Valine tRNA ligase  | 1003,86            | *                        | *                    |
| RL331  | 50S ribosomal protein L33   | 4993,96            | *                        | *                    |
| RL36   | 50S ribosomal protein L36   | 2516,8             | *                        | *                    |
| <b>Transport</b>                                   |   |                    |                          |                      |
| Q49XJ3   | ATPase component of ABC transporter with duplicated APTase domain | 1638,48            | *                        | *                    |
| <b>Biogenesis of cell wall</b>                     |   |                    |                          |                      |
| Q49W71   | D alanine poly phosphoribitol ligase                              | 1024,91            | *                        | *                    |
| Q49WE7   | UDP N acetylmuramoyl L alanyl D glutamate ligase                  | 976,16             | *                        | *                    |
| <b>Nitrogen, sulfur and selenium metabolism</b>    |   |                    |                          |                      |
| ASSY   | Argininosuccinate synthase  | 1815,98            | *                        | *                    |
| CARA   | Carbamoyl phosphate synthase small chain                          | 1409,03            | *                        | *                    |
| Q49W55   | Cysteine desulfurase  | 1334,59            | *                        | *                    |
| URE2   | Urease subunit beta   | 5105,32            | 1,40                     | 0                    |
| UREE   | Urease accessory protein UreE                                     | 2533,29            | 1,35                     | 0                    |
| <b>Stress response</b>                             |   |                    |                          |                      |
| CATA   | Catalase  | 15932,77           | 1,42                     | 0                    |
| Q49VW2   | Thioredoxin reductase   | 1876,88            | *                        | *                    |
| <b>Unclassified proteins</b>                       |   |                    |                          |                      |
| Q49UP8   | Putative GTPase   | 1251,04            | *                        | *                    |
| Q49XX0   | Uncharacterized protein   | 896,97             | *                        | *                    |
| Y1241  | UPF0403 protein SSP1241   | 1194,61            | *                        | *                    |

\* Proteins detected exclusively in the protein extract obtained after incubation of *S. saprophyticus* in pH 5.5.

<sup>1</sup> Accession number provided by Uniprot Database (<http://www.uniprot.org/>).

<sup>2</sup> PLGS score is calculated by different mathematical models for peptide and fragment assignment prediction. Acceptable score values take into account protein identification with a minimum confidence level of 95% and a false discovery rate of 4%.

<sup>3</sup> Fold-change values were calculated by dividing the values of protein abundance (in fmol) from *S. saprophyticus* incubated in pH 5.5 by the abundance in the control condition. Proteins with a minimum fold-change of 35% (fold change  $\geq 1,35$ ) were considered up-regulated.

<sup>4</sup> *p*-value of the fold change. *P*-values less than 0.05 and higher than 0.95 were considered statistically significant.

**Table 2 – *S. saprophyticus* down-regulated proteins in response to acid pH treatment.**

| Accession number <sup>1</sup>                                   | Protein description   | Score <sup>2</sup> | Fold change <sup>3</sup> | <i>p</i> value <sup>4</sup> |
|---|---|--------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Glycolysis</b>   |   |                    |                          |                             |
| Q49YC8  | 6 phosphofruktokinase                                       | 1283,9             | 0,58                     | 1                           |
| TPIS  | Triosephosphate isomerase                                   | 21579,32           | 0,64                     | 1                           |
| Q49VZ9  | Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase                    | 57600,33           | 0,68                     | 1                           |
| PGK   | Phosphoglycerate kinase OS <i>Staphylococcus</i>            | 18523,86           | 0,67                     | 1                           |
| GPMI  | 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase | 5628,52            | 0,60                     | 1                           |
| ENO   | Enolase   | 55690,06           | 0,70                     | 1                           |
| <b>Entner Doudoroff</b>   |   |                    |                          |                             |
| Q49ZH5  | Glucose 1 dehydrogenase                                     | 1080,69            | 0,57                     | 1                           |
| <b>Lactic acid and acetate fermentation</b>                     |   |                    |                          |                             |
| ACKA  | Acetate kinase  | 3561,75            | 0,72                     | 1                           |
| LDH   | L lactate dehydrogenase                                     | 32105,91           | 0,43                     | 1                           |
| <b>Lactose catabolism</b>                                       |   |                    |                          |                             |
| Q49VP7  | Tagatose 6 phosphate kinase                                 | 2486,98            | *                        | *                           |
| <b>Tricarboxilic acid cycle</b>                                 |   |                    |                          |                             |
| Q49YC5  | Citrate synthase  | 859,96             | 0,74                     | 1                           |
| FUMC  | Fumarate hydratase class II                                 | 1015,93            | 0,66                     | 1                           |
| ODO2  | Dihydrolipoyl succinyltransferase                           | 3288,2             | 0,73                     | 1                           |
| Q49YC4  | Isocitrate dehydrogenase NADP                               | 7390,18            | 0,64                     | 1                           |
| Q4A0T8  | Probable malate quinone oxidoreductase                      | 1711,34            | 0,71                     | 1                           |
| SUCC  | Succinyl CoA ligase ADP forming subunit                     | 8775,03            | 0,71                     | 1                           |
| Q49X33  | Succinyl CoA ligase ADP forming subunit                     | 22896,7            | 0,63                     | 1                           |
| <b>Energy</b>   |   |                    |                          |                             |
| ATPA  | ATP synthase subunit alpha                                  | 10170,93           | 0,58                     | 1                           |
| ATPB  | ATP synthase subunit beta                                   | 6255,57            | 0,57                     | 1                           |
| ATPD  | ATP synthase subunit delta                                  | 1033,65            | 0,63                     | 1                           |
| GUAA  | GMP synthase glutamine hydrolyzing                          | 3224,78            | 0,59                     | 1                           |
| <b>Polysaccharide metabolism</b>                                |   |                    |                          |                             |
| Q4A113  | Putative UDP glucose 6 dehydrogenase                        | 1327,27            | 0,68                     | 1                           |
| Q49ZA2  | Glutamine fructose 6 phosphate aminotransferase             | 3396,35            | 0,69                     | 1                           |
| <b>Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups</b> |   |                    |                          |                             |
| RISB  | 6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase                     | 2163,37            | 0,66                     | 1                           |
| LIPA  | Lipoyl synthase   | 2456,66            | 0,66                     | 1                           |
| HEM3  | Porphobilinogen deaminase                                   | 1358,96            | 0,65                     | 1                           |
| <b>Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism</b>              |   |                    |                          |                             |
| UPP   | Uracil phosphoribosyltransferase                            | 8818,75            | 0,70                     | 1                           |
| IMDH  | Inosine 5 monophosphate dehydrogenase                       | 9847,34            | 0,65                     | 1                           |
| KPRS  | Ribose phosphate pyrophosphokinase                          | 2708,79            | 0,64                     | 1                           |

|   |   |          |      |   |
|---|---|----------|------|---|
| NDK   | Nucleoside diphosphate  | 3929,63  | 0,55 | 1 |
| Q49WJ8  | Phosphoribosylamine glycine ligase                                | 1930,66  | *    | * |
| PURQ  | Phosphoribosylformylglycinamide synthase                          | 1554,77  | 0,42 | 1 |
| PUR7  | Phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthase          | 2776,38  | 0,49 | 1 |
| PYRR  | Bifunctional protein PyrR   | 1112,83  | 0,25 | 1 |
| Q49WJ1  | Phosphoribosylformylglycinamide synthase                          | 8028,56  | *    | * |
| PUR9  | Bifunctional purine biosynthesis protein                          | 2077,01  | 0,47 | 1 |
| Q4A0U9  | Anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase activator         | 1057,4   | 0,50 | 1 |
| Q49YN1  | HIT family protein  | 1977,55  | *    | * |
| <b>Cell cycle and DNA processing</b>                                |   |          |      |   |
| Q49VS9  | Ribonucleoside diphosphate reductase                              | 1233,53  | 0,61 | 1 |
| Q49VT0  | Ribonucleoside diphosphate reductase                              | 2969,84  | 0,61 | 1 |
| RECA  | Protein RecA  | 1812,44  | 0,57 | 1 |
| Q4A179  | DNA polymerase III subunit beta                                   | 1827,93  | 0,73 | 1 |
| Q49UG1  | Putative plasmid replication associated                           | 1024,59  | 0,66 | 1 |
| Q49YG7  | Catabolite control protein  | 1807,41  | 0,60 | 1 |
| <b>Transcription</b>  |   |          |      |   |
| Q49XS7  | Bacterial nucleoid DNA binding protein                            | 143550,5 | 0,70 | 1 |
| Q49V17  | Putative RNA binding protein                                      | 3458,54  | 0,65 | 1 |
| RPOE  | Probable DNA directed RNA polymerase subunit                      | 1683,57  | 0,71 | 1 |
| Q49YC3  | Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein | 1198,49  | 0,51 | 1 |
| Q49V46  | Transcription termination/antitermination protein                 | 2192,08  | 0,69 | 1 |
| <b>Protein synthesis and modification</b>                           |   |          |      |   |
| RL35  | 50S ribosomal protein L35   | 8097,79  | 0,71 | 1 |
| SYP   | Proline tRNA ligase   | 1855,32  | 0,71 | 1 |
| Q49WF7  | Putative lipote protein ligase A                                  | 1165,81  | 0,71 | 1 |
| <b>Amino acid metabolism</b>  |   |          |      |   |
| GLYA  | Serine hydroxymethyltransferase                                   | 18129,52 | 0,68 | 1 |
| Q49V22  | Cysteine synthase   | 15290,54 | 0,64 | 1 |
| HIS8  | Histidinol phosphate aminotransferase                             | 1515,56  | 0,54 | 1 |
| GCSPB   | Glycine dehydrogenase decarboxylating protein                     | 1429,7   | *    | * |
| GCSH  | Glycine cleavage system H protein                                 | 13562,62 | 0,71 | 1 |
| GCST  | Aminomethyltransferase  | 2596,42  | 0,66 | 1 |
| DHA   | Alanine dehydrogenase   | 9983,63  | 0,72 | 1 |
| Q49V60  | Putative 2 amino 3 ketobutyrate coenzyme A ligase protein         | 4451     | 0,71 | 1 |
| ROCA  | 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase                           | 4372,3   | 0,47 | 1 |
| <b>Cellular transport, transport facilities and transport route</b> |   |          |      |   |
| Q49ZA5  | Phosphotransferase system mannitol specific                       | 4941,47  | 0,42 | 1 |
| METN  | Methionine import ATP binding protein MetN                        | 1350,94  | *    | * |
| FTN   | Ferritin  | 17702,9  | 0,59 | 1 |
| <b>Nitrogen, sulfur and selenium metabolism</b>                     |   |          |      |   |
| Q49W97  | Glutamate dehydrogenase   | 3211,08  | 0,59 | 1 |
| Q49VA2  | Branched chain amino acid aminotransferase                        | 1212,42  | 0,48 | 1 |
| <b>Stress response</b>  |   |          |      |   |
| ISAA  | Probable transglycosylase IsaA                                    | 4905,79  | 0,44 | 1 |

|                              |   |          |      |   |
|------------------------------|---|----------|------|---|
| CSPA                         | Cold shock protein CspA                     | 8630,04  | 0,72 | 1 |
| Y1056                        | Putative universal stress protein           | 55669,16 | 0,66 | 1 |
| MSRB                         | Peptide methionine sulfoxide reductase      | 11451,21 | 0,70 | 1 |
| Q49XU0                       | Staphylococcal respiratory response protein | 1112,59  | 0,68 | 1 |
| <b>Iron metabolism</b>       |   |          |      |   |
| GSA2                         | Glutamate 1 semialdehyde 2 1 aminomutase    | 1920,47  | 0,68 | 1 |
| Y2125                        | Putative heme-dependent peroxidase          | 4416,03  | 0,70 | 1 |
| <b>Unclassified proteins</b> |   |          |      |   |
| Y2164                        | Uncharacterized epimerase dehydratase       | 1326,12  | 0,67 | 1 |
| FOLD                         | Bifunctional protein FOLD                   | 7504,37  | 0,68 | 1 |
| Y1389                        | Probable tautomerase                        | 7105,86  | 0,55 | 1 |
| Y1770                        | UPF0477 protein                             | 3273,63  | 0,66 | 1 |
| UP355                        | Uncharacterized protein                     | 14255,95 | 0,68 | 1 |
| Q49YG9                       | Uncharacterized protein                     | 1243,4   | 0,70 | 1 |
| Q49XA3                       | Uncharacterized protein                     | 9704,11  | 0,70 | 1 |
| Q49W75                       | Uncharacterized protein                     | 7590,45  | 0,69 | 1 |
| Q49W44                       | Uncharacterized protein                     | 8254,31  | 0,71 | 1 |
| Q49UT6                       | Uncharacterized protein                     | 1301,25  | 0,66 | 1 |
| Q49XB9                       | Uncharacterized protein                     | 1478,51  | 0,63 | 1 |
| Q49Z77                       | Uncharacterized protein                     | 1936,54  | 0,61 | 1 |
| Q4A056                       | Uncharacterized protein                     | 2964,91  | 0,13 | 1 |
| Y1964                        | Uncharacterized protein                     | 3821,83  | 0,54 | 1 |
| Q49ZM9                       | Uncharacterized protein                     | 1147,7   | *    | * |
| Y1144                        | UPF0297 protein                             | 1632,72  | *    | * |
| Y1183                        | UPF0365 protein                             | 1566,02  | *    | * |

\* Proteins detected exclusively in the protein extract obtained after incubation of *S. saprophyticus* incubated in pH 7.

<sup>1</sup>Accession number provided by Uniprot Database (<http://www.uniprot.org/>).

<sup>2</sup> PLGS score is calculated by different mathematical models for peptide and fragment assignment prediction. Accept score values take into account protein identification with a minimum confidence level of 95% and a false discovery rate of 4%.

<sup>3</sup> Fold-change values were calculated by dividing the values of protein abundance (in fmol) from *S. saprophyticus* incubated in pH 5.5 by the abundance in the control condition. Proteins with a minimum fold-change of 35% (fold change  $\leq 0,74$ ) considered down-regulated.

<sup>4</sup> p-value of the fold change. P-values less than 0.05 and higher than 0.95 were considered statistically significant.

**Table 3 - *S. saprophyticus* up-regulated proteins in response to alkaline pH treatment.**

| Accession number <sup>1</sup>                      | Protein description                                     | Score <sup>2</sup> | Fold change <sup>3</sup> | p value <sup>4</sup> |
|--|---|--------------------|--------------------------|----------------------|
| <b>Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism</b> |   |                    |                          |                      |
| URK  | Uridine kinase  | 1492,09            | 2,14                     | 1                    |
| Q49V00   | Putative deoxyribonuclease                              | 906,42             | *                        | *                    |
| Q49V19   | Putative hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase | 1442,58            | *                        | *                    |
| <b>Amino acid metabolism</b>                       |   |                    |                          |                      |
| GCSPA  | Glycine dehydrogenase decarboxylating P protein         | 2194,81            | *                        | *                    |
| Q4A0Q2   | Glycine betaine aldehyde dehydrogenase                  | 1429,55            | *                        | *                    |
| Q49YG8   | DAHPh synthetase chorismate mutase                      | 2290,24            | *                        | *                    |
| ROCA   | 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase                 | 7889,14            | 1,40                     | 1                    |
| <b>Gluconeogenesis</b>                             |   |                    |                          |                      |

|   |   |         |      |   |
|---|---|---------|------|---|
| PCKA  | Phosphoenolpyruvate carboxykinase                     | 1116,6  | 1,42 | 1 |
| <b>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</b>              |   |         |      |   |
| IDI2  | Isopentenyl diphosphate delta isomerase               | 1115,17 | *    | * |
| <b>Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups</b> |   |         |      |   |
| RISB  | 6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase               | 1896,1  | 5,16 | 1 |
| <b>Transcription</b>  |   |         |      |   |
| Q49X65  | Putative transcriptional regulator                    | 1016,62 | *    | * |
| Q49Z20  | Anti sigma factor antagonist                          | 1751,14 | *    | * |
| <b>Protein synthesis</b>  |   |         |      |   |
| RS18  | 30S ribosomal protein S18                             | 1074,73 | *    | * |
| RL28  | 50S ribosomal protein L28                             | 1406,87 | *    | * |
| RL36  | 50S ribosomal protein L36                             | 9991,42 | *    | * |
| RL32  | 50S ribosomal protein L32                             | 2103,97 | *    | * |
| <b>Stress response</b>  |   |         |      |   |
| Q49VW2  | Thioredoxin reductase                                 | 1598,46 | *    | * |
| ISAA  | Transglycosylase IsaA                                 | 7701,96 | 2,53 | 1 |
| Q49XA7  | Response regulator                                    | 1064,04 | *    | * |
| <b>Transport</b>  |   |         |      |   |
| Q49ZK8  | Ferrichrome ABC transporter substrate binding-protein | 1069,03 | *    | * |
| <b>Unclassified proteins</b>                                    |   |         |      |   |
| Q49V88  | Uncharacterized protein                               | 1178,74 | *    | * |
| Q49VC9  | Uncharacterized protein                               | 1276,35 | *    | * |
| Q49VV4  | Uncharacterized protein                               | 2666,63 | *    | * |
| Q49Z77  | Uncharacterized protein                               | 2891,38 | 1,42 | 1 |
| Y1964   | Uncharacterized protein                               | 4669,27 | 1,49 | 1 |
| Y1897   | UPF0337 protein                                       | 1683,65 | *    | * |
| NAGD  | Protein NagD homolog                                  | 1233,62 | *    | * |
| Q49XJ4  | Putative aldo keto reductase                          | 1018,33 | *    | * |

\* Proteins detected exclusively in the protein extract obtained after incubation of *S. saprophyticus* in pH 9.

<sup>1</sup> Accession number provided by Uniprot Database (<http://www.uniprot.org/>).

<sup>2</sup> PLGS score is calculated by different mathematical models for peptide and fragment assignment prediction. Acceptable score values take into account protein identification with a minimum confidence level of 95% and a false discovery rate of 4%.

<sup>3</sup> Fold-change values were calculated by dividing the values of protein abundance (in fmol) from *S. saprophyticus* incubated in pH 5.5 by the abundance in the control condition. Proteins with a minimum fold-change of 35% (fold change  $\geq 1,35$ ) were considered up-regulated.

<sup>4</sup> *p*-value of the fold change. *P*-values less than 0.05 and higher than 0.95 were considered statistically significant.

**Table 4 - *S. saprophyticus* down-regulated proteins in response to alkaline pH treatment.**

| Accession number                                   | Protein description                   | Score    | Fold change | <i>p</i> value |
|--|---------------------------------------|----------|-------------|----------------|
| <b>Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism</b> |                                       |          |             |                |
| IMDH   | Inosine 5 monophosphate dehydrogenase | 17067,92 | 0,72        | 0              |
| KCY  | Cytidylate kinase                     | 2152,5   | 0,61        | 0              |
| <b>Amino acid metabolism</b>                       |                                       |          |             |                |

|   |  |          |      |   |
|---|--|----------|------|---|
| HIS8  | Histidinol phosphate aminotransferase                            | 2136,1   | 0,62 | 0 |
| <b>C-compound and carbohydrate metabolism</b>                   |  |          |      |   |
| ALD1  | Putative aldehyde dehydrogenase                                  | 3093,21  | 0,68 | 0 |
| Y1389   | 4-oxalocrotonate tautomerase                                     | 10687,02 | 0,70 | 0 |
| Q49ZA5  | Phosphotransferase system mannitol specific                      | 6434,24  | *    | * |
| <b>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</b>              |  |          |      |   |
| Q49WE0  | Enoyl acyl carrier protein reductase                             | 2766,26  | 0,58 | 0 |
| LIPA  | Lipoyl synthase  | 1949,68  | 0,66 | 0 |
| <b>Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups</b> |  |          |      |   |
| HEMH  | Ferrochelataze   | 11975,33 | 0,66 | 0 |
| GUAA  | GMP synthase glutamine hydrolyzing                               | 3283,61  | 0,64 | 0 |
| <b>Glycolysis</b>   |  |          |      |   |
| PGK   | Phosphoglycerate kinase  | 21016,54 | 0,70 | 0 |
| Q49VZ9  | Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase                         | 59329,59 | 0,71 | 0 |
| GPMI  | 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase      | 4746,69  | 0,60 | 0 |
| GPMA  | 2 3 bisphosphoglycerate dependent phosphoglycerate phosphomutase | 8878,33  | 0,66 | 0 |
| Q49YC8  | 6 phosphofructokinase  | 1125,46  | *    | * |
| <b>Lactic acid and acetate fermentation</b>                     |  |          |      |   |
| ACKA  | Acetate kinase   | 2231,38  | 0,59 | 0 |
| LDH   | L lactate dehydrogenase  | 44530,05 | 0,59 | 0 |
| <b>Tricarboxilic acid cycle</b>                                 |  |          |      |   |
| Q4A102  | Probable malate quinone oxidoreductase                           | 5568,27  | 0,45 | 0 |
| Q4A0T8  | Probable malate quinone oxidoreductase                           | 25,05    | 0,52 | 0 |
| <b>Oxidative phosphorylation</b>                                |  |          |      |   |
| Y1834   | NADH dehydrogenase FAD containing subunit                        | 13390,54 | 0,69 | 0 |
| <b>Cell cycle and DNA processing</b>                            |  |          |      |   |
| Q4A0U9  | Anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase                  | 2555,12  | 0,73 | 0 |
| Q49UG1  | Putative plasmid replication associated protein                  | 1622,1   | *    | * |
| <b>Transcription</b>  |  |          |      |   |
| RPOZ  | DNA directed RNA polymerase subunit omega                        | 4199     | 0,72 | 0 |
| Q49XU0  | Staphylococcal respiratory response protein                      | 1291,27  | 0,71 | 0 |
| Q49X51  | Transcription termination antitermination protein                | 4371,63  | 0,68 | 0 |
| Q49Y64  | Putative transcriptional regulator                               | 6293,04  | 0,73 | 0 |
| Q49VN3  | Putative transcriptional regulator                               | 9779,15  | 0,60 | 0 |
| Q49Y04  | RNA polymerase sigma factor                                      | 1403,61  | 0,64 | 0 |
| RPOE  | DNA directed RNA polymerase subunit                              | 2009,21  | *    | * |
| GREA  | Transcription elongation factor GreA                             | 21512,17 | 0,70 | 0 |
| SYD   | Aspartate tRNA ligase  | 2828,24  | 0,70 | 0 |
| SYT   | Tyrosine tRNA ligase   | 1810,29  | 0,70 | 0 |
| RNJ1  | Ribonuclease J 1   | 1124,34  | *    | * |
| <b>Protein synthesis</b>  |  |          |      |   |
| SYR   | Arginine tRNA ligase   | 1155,61  | *    | * |
| EFTS  | Elongation factor Ts   | 20619,56 | 0,70 | 0 |
| <b>Biogenesis of cell wall</b>                                  |  |          |      |   |

|   |  |          |      |   |
|---|--|----------|------|---|
| MURA1   | UDP N acetylglucosamine 1<br>carboxyvinyltransferase | 1491,77  | *    | * |
| DDL   | D alanine D alanine ligase                           | 5764,07  | 0,73 | 0 |
| Q4A113  | Putative UDP glucose 6 dehydrogenase                 | 2685,57  | 0,68 | 0 |
| DLTC  | D alanine poly phosphoribitol ligase subunit         | 4352,37  | 0,53 | 0 |
| <b>Nitrogen, sulfur and selenium metabolism</b> |  |          |      |   |
| URE1  | Urease subunit alpha                                 | 2998,87  | 0,68 | 0 |
| URE2  | Urease subunit beta                                  | 1911,27  | 0,65 | 0 |
| UREG  | Urease accessory protein UreG                        | 13776,47 | 0,68 | 0 |
| <b>Stress response</b>                          |  |          |      |   |
| Q49Z86  | Starvation inducible DNA binding protein             | 30434,01 | 0,59 | 0 |
| Q49YD5  | Putative universal stress protein                    | 11863,75 | 0,59 | 0 |
| SODM  | Superoxide dismutase Mn Fe                           | 24637,57 | 0,57 | 0 |
| AHPC  | Alkyl hydroperoxide reductase subunit C              | 79154,94 | 0,53 | 0 |
| Q49UT7  | Alkyl hydroperoxide reductase                        | 1935,96  | 0,68 | 0 |
| Y379  | Flavin NADPH nitroreductase                          | 2717,38  | 0,69 | 0 |
| Q49UL6  | Flavoheomprotein nitric oxide dioxygenase            | 7824,14  | 0,53 | 0 |
| Q49WI6  | Flavoheomprotein nitric oxide dioxygenase            | 16060,56 | 0,57 | 0 |
| <b>Transport</b>                                |  |          |      |   |
| Q49W53  | Iron regulated ABC transporter SufC                  | 3274,41  | 0,70 | 0 |
| METN  | Methionine import ATP binding protein Met            | 1350,94  | *    | * |
| TIG   | Trigger factor                                       | 25656,08 | 0,64 | 0 |
| <b>Unclassified proteins</b>                    |  |          |      |   |
| Q49VT5  | Uncharacterized protein                              | 1680,08  | *    | * |
| Q49UT6  | Uncharacterized protein                              | 2248,8   | 0,58 | 0 |
| Q49YW8  | Uncharacterized protein                              | 4627,78  | *    | * |
| Q49ZM9  | Uncharacterized protein                              | 1147,7   | *    | * |
| Q4A013  | Uncharacterized protein                              | 1680,89  | 0,67 | 0 |
| Q49Z99  | Putative hydrolase                                   | 1250,32  | *    | * |
| Y1144   | UPF0297 protein                                      | 1632,72  | *    | * |
| Y1024   | UPF0478 protein                                      | 3815,68  | 0,68 | 0 |
| UP355   | UPF0355 protein                                      | 11043,4  | 0,72 | 0 |
| Q49WN4  | Putative GTPase                                      | 1847,1   | 0,53 | 0 |
| Q49WB4  | Putative ATPase subunit                              | 60,21    | 0,61 | 0 |

\* Proteins detected exclusively in the protein extract obtained after incubation of *S. saprophyticus* in pH 7.

<sup>1</sup> Accession number provided by Uniprot Database (<http://www.uniprot.org/>).

<sup>2</sup> PLGS score is calculated by different mathematical models for peptide and fragment assignment prediction. Acceptable score values take into account protein identification with a minimum confidence level of 95% and a false discovery rate of 4%.

<sup>3</sup> Fold-change values were calculated by dividing the values of protein abundance (in fmol) from *S. saprophyticus* incubated in pH 5.5 by the abundance in the control condition. Proteins with a minimum fold-change of 35% (fold change  $\leq 0,74$ ) were considered down-regulated.

<sup>4</sup> *p*-value of the fold change. *P*-values less than 0.05 and higher than 0.95 were considered statistically significant.