

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

ANDREA SANTANA DE OLIVEIRA

**PERFIL COMPARATIVO DO EXOPROTEOMA DE 3 ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus saprophyticus***

Goiânia
2016

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

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

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Andrea Santana de Oliveira

Título do trabalho: Perfil Comparativo do Exoproteoma de 3 Isolados Clínicos de *Staphylococcus Saprophyticus*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO

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

Andrea Santana de Oliveira
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 28 / 03 / 17

ANDREA SANTANA DE OLIVEIRA

**PERFIL COMPARATIVO DO EXOPROTEOMA DE 3 ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus saprophyticus***

Dissertação de mestrado apresentado à Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Biologia Molecular de Microrganismos

Orientador: Prof^a Dr^a Juliana Alves Parente Rocha

Goiânia
2016

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

Oliveira, Andrea Santana de
Perfil Comparativo do Exoproteoma de 3 Isolados Clínicos de *Staphylococcus saprophyticus* [manuscrito] / Andrea Santana de Oliveira. - 2016.
xx, 79 f.

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

Bibliografia. Apêndice.

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

1. *S. saprophyticus*. 2. infecção urinária. 3. virulência. 4. proteômica. 5. proteínas extracelulares. I. Rocha, Juliana Alves Parente, orient. II. Título.

CDU 577.2



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

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 039**

2 Aos trinta dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis
3 (30/09/2016), às nove horas, no Anfiteatro do ICB II/UFG, reuniram-se os
4 componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Juliana Alves Parente,**
5 **Profa. Dra. Marcia Giambiagi de Marval** e **Prof. Dr. Juliano Domiraci**
6 **Pacez** para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada,
7 procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**PERFIL**
8 **COMPARATIVO DO EXOPROTEOMA DE 3 ISOLADOS CLÍNICOS DE**
9 *Staphylococcus saprophyticus.*", em nível de mestrado, área de concentração
10 em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Andrea Santana de**
11 **Oliveira**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
12 Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela
13 presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra,
14 a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 35
15 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a
16 apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, 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
25 do 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 11 horas e 20 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

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

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

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

Profa. Dra. Marcia Giambiagi de Marval
UFRJ/RJ

Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez
UFG/GO

*Dedico este trabalho à minha
linda família e ao meu amor,
pelo incentivo, dedicação e
carinho incondicionais*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, acima de tudo, por me dar o dom da vida e por me conceder a oportunidade de estudar, de aprender, de buscar ainda mais o conhecimento que Ele mesmo criou, e deixou escondido no ser humano a capacidade de desvendar esse mistério que é a vida. Agradeço também por me proporcionar saúde física e emocional para correr atrás em conquistar meus objetivos, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos, e por me mostrar que sem Ele eu nada sou.

Em segundo lugar, à minha família tão amada, meus pais José e Rosa, e meus irmãos Robson e Júnior, pela compreensão, pelo apoio, pelas palavras de motivação, em meio ao desânimo, pelas palavras de conforto em meio ao desespero, e pelo ombro amigo concedido em meio ao choro inevitavelmente derramado. Enfim, pelo amor incondicional compartilhado na minha jornada até aqui.

Agradeço em especial às duas mulheres da minha vida, as quais, orgulhosamente eu chamo de mãe e sogra, que não se pouparam em permanecer de joelhos no chão, clamando por proteção, por cuidado e pela sabedoria de Deus na minha vida. Ao meu companheiro de vida, André Victor, aquele que mais de perto vivenciou todo o drama da finalização de um curso de mestrado. Pela paciência, pela compreensão, por entender a minha ausência em alguns momentos, e por orar por mim, quando eu nem mais sabia o que pedir.

À professora Daniela de Melo e Silva, que acreditou na minha capacidade, mesmo quando eu era apenas uma aluna de iniciação científica, e que contribuiu, de uma forma ou de outra, na minha chegada até aqui.

Em especial, à minha querida orientadora Juliana Parente (Ju). Pela oportunidade em trabalharmos juntas neste projeto, e pela humanidade, profissionalismo e competência com que levou e irá levar essa parceria a gerar muitos frutos. Pelo apoio, compreensão e paciência em respeitar o meu tempo de concretizar cada passo, cada etapa deste trabalho. Pelas vezes em que foi para bancada só para me ensinar um procedimento que eu, inexperiente, não fazia ideia por onde começar. Pela disponibilidade e gentileza em me atender, para tirar dúvidas, aconselhar e me lembrar, em meio às dificuldades, que 'no final tudo dá certo'. Enfim, sem palavras para expressar a gratidão e honra que sinto pela sua contribuição na minha formação como Mestre! Hoje eu posso dizer que valeu a

pena cada momento desses 28 meses, e que eu não poderia ter tido uma orientadora e companheira melhor nessa caminhada.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Célia Maria Soares de Almeida, Maristela Pereira, Silvia Izacc, Alexandre Bailão, Juliano Paccetz, e em especial ao Clayton Borges, por me acolherem e me proporcionarem o conhecimento científico adquirido em minha passagem pelo LBM.

*Aos professores Marcia Giambiagi de Marval e Juliano Domiraci Paccetz, por aceitarem o convite de fazer parte da banca examinadora desta dissertação e contribuir positivamente para o aperfeiçoamento deste trabalho. À Marcia Giambiagi de Marval, mais uma vez, e a Lennart Marlinghaus, por disponibilizarem os cepas clínicas de *Staphylococcus saprophyticus* utilizados neste estudo.*

À comissão científica do Congresso de Genética do Centro-Oeste por reconhecer e honrar este trabalho com o Prêmio de Menção Honrosa na área de Genética de Microrganismos, em 2016.

Ao apoio financeiro disponibilizado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), para a realização deste trabalho.

Agradeço de coração também aos queridos do LBM, pela convivência diária nesses 28 meses. Agradeço em especial pela ajuda compartilhada pelas alunas de iniciação científica Janaina e Geovanna que me acolheram logo no início do curso, quando eu pouco sabia sobre a rotina de um laboratório de biologia molecular com foco em microrganismos. Agradeço também aos colegas que logo depois, de pronto se dispuseram a me ensinar tudo aquilo que eu precisava aprender, e hoje me proporciona este universo de possibilidades, que é a ciência. Destes, eu cito, com muito orgulho: Lilian Baeza, Kléber Santiago, Laurine Lacerda, Mariana Tomazett, Lucas Oliveira, Isabella Rosa, Alex Carvalho, Leandro do Prado, Karla Sousa, André Moreira e Aparecido de Sousa. E foi muito gratificante, ver que nestes últimos dias, eu pude retribuir a ajuda a alguns de vocês. Vê-los solicitando a minha ajuda para algum procedimento no laboratório, ou até mesmo, pedindo a minha opinião sobre algo e levando-a em consideração, me fez perceber o quanto eu cresci durante todo esse tempo, o quanto eu cresci como pessoa e como profissional. Agradeço também a amizade e pelos momentos vividos com a Rosiane Fernandes, Bianca Souza, Guilherme Augusto, Mirian Vieira, Janaina Siqueira, Sheila Sestari, Amanda Alves, Giovanna da Silva, Marta Araújo, Lucas

Nojosa, Igor Godinho e Davi Vinícius. Obrigado por deixarem a rotina no LBM mais leve e divertida!

*Às minhas amigas e irmãs de coração Isabella Santana, Polyanna Rodrigues, Flávia Rocha, Iasmyn Andrade, Lydiane Rodrigues, Greice Aguiar, Nayra Maressa, por ouvirem minhas preocupações, e mesmo que longe, me darem forças em suas palavras para seguir em frente. Aos companheiros que vibraram com a minha aprovação num curso de mestrado, que caminharam comigo durante toda jornada, e que continuam do meu lado, me apoiando, mesmo não entendendo nada sobre *S. saprophyticus*: Laisse Raphaela, Poliana Eduarda, Marcello Victor, Jéssyka Ferreira, Helen Carla, Rangel Brandão, Caio Mota, Bruno de Brito, Júlia Graciela, Robson Schwamm, André Belém e Roniery Silva. Sou muita grata por ter vocês ao meu lado, quero dividir com cada um essa conquista, essa vitória, essa alegria, que não teria ocorrido da mesma forma sem a presença e a contribuição de cada um na minha vida.*

E mais uma vez, eu agradeço a Deus, por colocar na minha vida pessoas tão especiais, que mais deveriam ser chamados de anjos! Muito obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	21
1.2 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	23
1.2.1 Epidemiologia e relevância clínica de <i>S. saprophyticus</i>	24
1.2.2 Diagnóstico laboratorial	26
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E ADAPTAÇÃO DE <i>S. saprophyticus</i>	27
1.4 PROTEÍNAS EXTRACELULARES E VIRULÊNCIA	30
1.5 O ESTUDO DOS PROTEOMAS	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 CULTIVO DE <i>S. saprophyticus</i>	37
4.2 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>S. saprophyticus</i>	37
4.3 AVALIAÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38
4.4 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)	38
4.5 DIGESTÃO POR TRIPSINA E PREPARO DE AMOSTRA PARA nanoUPLC-MS ^E	39
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR nanoUPLC-MS ^E	40
4.7 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	40
4.8 AVALIAÇÃO DE DNA GENÔMICO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	41
4.9 SEQUENCIAMENTO GÊNICO DO ANTÍGENO ESTAFILOCÓCICO SECRETADO A (SsaA)	42

4.10 OBTENÇÃO DE SORO CONTENDO ANTICORPOS POLICLONAIS ESPECÍFICOS PARA SsaA	42
4.11 ANÁLISES POR WESTERN-BLOTTING.....	42
5 RESULTADOS	44
5.1 VALIDAÇÃO DOS EXTRATOS DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES OBTIDOS	44
5.2 PROTEÍNAS DETECTADAS NO EXOPROTEOMA DE <i>S. saprophyticus</i>	45
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO ESTAFILOCÓCICO SECRETADO A (SsaA) POR WESTERN-BLOTTING.....	55
5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>ssaA</i>	56
6 DISCUSSÃO	60
6.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM COMUM NO EXOPROTEOMA DE <i>S. saprophyticus</i> , cepas ATCC 15305, 7108 e 9325	60
6.1.1 Proteínas secretadas relacionadas ao metabolismo de carboidratos	60
6.1.2 Proteínas secretadas relacionadas à defesa contra o estresse	64
6.1.3 Proteínas hipotéticas	66
6.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS ENTRE OS CEPAS DE <i>S. saprophyticus</i>	66
6.2.1 O antígeno estafilocócico secretado A (SsaA)	66
6.2.2 Expressão exclusiva de proteases	67
6.2.3 Outras proteínas diferencialmente secretadas	69
7 CONCLUSÕES	71
8 PERSPECTIVAS	72
9 REFERÊNCIAS	73
DADOS SUPLEMENTARES	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia das bactérias do gênero *Staphylococcus* (JUNG et al., 2010).

Figura 2. Análise de lise celular e perfil da secreção de proteínas de *S. saprophyticus* durante 3 períodos de incubação e. A: A sensibilidade da PCR para o gene *rpsA* foi avaliada utilizando DNA genômico de *S. saprophyticus* ATCC 15305 (cinco diluições) como um molde (50 ng e 1 pg). A PCR foi realizada com 5 concentrações de DNA genômico: 50 ng (1), 5 ng (2), 50 pg (3), 5 pg (4) e 1 pg (5). Um controle negativo sem DNA também foi utilizado no ensaio (6). B: PCR realizada com sobrenadante de cultura (2 mL) de *S. saprophyticus* concentradas em filtro de 3 kDa, obtida após 1 hora (1), 3 horas (2) e 6 horas (3) de incubação em meio BHI. C: Perfil do exoproteoma de *S. saprophyticus* após incubação de 1 hora, 3 horas e 6 horas (da esquerda para a direita). À esquerda é mostrado o marcador molecular de proteínas, de peso conhecido, em kDa.

Figura 3. Diagrama de Venn da comparação dos exoproteomas das cepas ATCC 15305, 7108 e 9325 de *S. saprophyticus*, mostrando o número de proteínas identificadas em cada análise.

Figura 4. Validação dos dados proteômicos com anticorpos policlonais anti-SsaA. A: Gel SDS-PAGE contendo os extratos de exoproteoma das 3 cepas analisadas: 1. ATCC 15305; 2. 7108; 3. 9325. B: Western-blotting realizado com soro contendo anticorpos policlonais anti-SsaA com as amostras de exoproteoma mostradas em A. Um marcador padrão de peso molecular conhecido (kDa) está indicado à esquerda do gel.

Figura 5. Análise da presença do gene codificante para SsaA em 3 cepas de *S. saprophyticus*. PCR realizada com primers específicos para o gene codificante de SsaA. 1. Controle negativo; 2. PCR com DNA genômico da cepa ATCC 15305 de *S. saprophyticus*; 3. PCR com DNA genômico da cepa 7108 de *S. saprophyticus*; 4. PCR com DNA genômico da cepa 9325 de *S. saprophyticus*. Um marcador de DNA de tamanho conhecido, em kb, é mostrado à esquerda da imagem.

Figura 6. Alinhamento do gene *ssaA* das cepas ATCC 15305, 9325 e 7108 de *S. saprophyticus*. O gene *SsaA* das 3 estirpes, após amplificação por PCR utilizando primers específicos, foram utilizados para sequenciamento com ambos os primers (sentido e

antissentido) em quadriplicata experimental. Por meio do sequenciamento pelo método de Sanger, foi possível sequenciar por completo a região codante do gene *ssaA* das três cepas. Em amarelo está destacado o ATG inicial da região codante e em vermelho está destacado o códon de parada do gene (TAA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305, 7108 e 9325, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela 2. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305 e 7108, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela 3. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305 e 9325, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela 4. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas 9325 e 7108, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela 5. Lista de proteínas detectadas exclusivamente no exoproteoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela 6. Lista de proteínas detectadas exclusivamente no exoproteoma de *S. saprophyticus* 7108, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela 7. Lista de proteínas detectadas exclusivamente no exoproteoma de *S. saprophyticus* 9325, classificadas de acordo com sua função biológica.

Tabela S1. Expressão de proteínas de *S. saprophyticus* 9325 em relação à *S. saprophyticus* 7108.

Tabela S2. Expressão de proteínas de *S. saprophyticus* 9325 em relação à *S. saprophyticus* ATCC 15305.

Tabela S3. Expressão de proteínas de *S. saprophyticus* 7108 em relação à *S. saprophyticus* ATCC 15305.

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D-SDS-PAGE – Do inglês, *2 Dimensional Electrophoresis Sulfate Dodecyl Sodium Polyacrylamide Electrophoresis*

Aas – Autolisina/Adesina de *Staphylococcus saprophyticus*

ACN – Acetonitrila

agr – Gene Regulador Acessório

AhpC – Alquil Hidroperóxido Redutase Subunidade C

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATL – Autolisinas Bifuncionais

ATP – Adenosina Trifosfato

BCIP – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolylphosphate

BHI – Do inglês, *Brain Heart Infusion*

BSA – Soro Albumina Bovina

CO₂ – Dióxido de Carbono

C-terminal – Porção carboxi-terminal de proteínas

CoEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CP – Cápsula Polissacarídica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTT – Ditioneitol

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GTP – Guanina Trifosfato

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

HLA – Alfa-Hemolisinas

IgG – Imunoglobulinas G

IRN – Intermediários Reativos de Nitrogênio

IsaA – Antígeno Imunodominante A

ITU – Infecções do Trato Urinário

kb – Kilo Base

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – Kilodaltons

KH_2PO_4 – Fosfato Monopotássico

LAP – Leucil Amino-peptidase

LDH – L-Lactato Desidrogenase

LPSN – Do inglês, *List of Prokariotic Names with Standing in Nomenclature*

MALDI-TOF MS – Do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MgCl_2 – Cloreto de Magnésio

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

MSCRAMMS – Componente de Superfície Microbiana Reconhedora de Moléculas da Matriz Adesiva

Na_2HPO_4 – Fosfato Dissódico

NaCl – Cloreto de Sódio

nanoUPLC-MS^E – Cromatografia Líquida de Ultra Desempeno em Nano escala, aclopada à Espectrometria de Massas *in tandem*

NBT – Do Inglês, *Nitroblue Tetrazolium*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

N-terminal – Porção Amino-Terminal de aminoácidos

O_2^- – Ânion Superóxido

OONO⁻ – Peroxinitrito

ORFs – Quadros de Leitura Aberta (Do inglês, *Open Reading Frames*)

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato (Do inglês, *Phosphate Saline Buffer*)

pb – Pares de Base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLGS – *ProteinLynx Global Server*

pSSP1 e pSSP2 – Plasmídeos de *S. saprophyticus*

Sar – Regulador Acessório Estafilocócico

SCC_{15305cap} – Cassete Cromossômico Estafilocócico/ elemento genético da Cápsula Polissacarídica de *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

SCC_{mecA} – Cassete Cromossômico Estafilocócico carreador do gene *mecA*

SCC_{15305RM} – Cassete Cromossômico Estafilocócico de *S. saprophyticus* ATCC 15305

SCN – Estafilococos Coagulase Negativos

SCP – Estafilococos Coagulase Positivos

SdrI – Do inglês, *Serina-Aspartate Repeat Protein I*

SDS –Dodecil Sulfato de Sódio

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

SOD – Supéroxido Dismutase

SsaA – Antígeno Estafilocócico secretado A

Ssp – Proteína Associada à Superfície de *Staphylococcus saprophyticus*

SssF – Proteína de Superfície de *Staphylococcus saprophyticus* F

TCA – Ácido Tricloroacético

TFA – Ácido Trifluoroacético

TPI – Triose-Fosfato Isomerase

Tris – Hidroximetil-Aminometano

TSS – Síndrome do Choque Tóxico

UafA – Fator de Uro-Aderência A

UafB – Fator de Uro-Aderência B

v/v – Volume por Volume

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência Intermediária à Vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes à Vancomicina

w/v – Peso por Volume

β – Beta

RESUMO

Staphylococcus saprophyticus é uma bactéria Gram-positiva responsável por infecções do trato geniturinário, acometendo principalmente mulheres jovens sexualmente ativas. Junto com *Escherichia coli*, é responsável por 90% das infecções em mulheres férteis, entretanto, pode causar infecções em homens e mulheres de todas as idades. O repertório de proteínas secretadas por microrganismos patogênicos é utilizado para garantir sucesso no estabelecimento da infecção e na persistência dentro do hospedeiro. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo principal a caracterização comparativa do proteoma extracelular de 3 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, com a finalidade de detectar possíveis diferenças na secreção de proteínas relacionadas à virulência e adaptação do microrganismo. As cepas utilizadas no estudo são denominadas de ATCC 15305, 7108 e 9325. Por meio da Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho acoplada à Espectrometria de Massas *in tandem* (UPLC-MS^E), foram identificadas um total de 159 proteínas. Dentre elas, 44 foram encontradas no exoproteoma dos 3 cepas, enquanto que 20 apenas nas cepas ATCC 15305 e 7108, 11 em ATCC 15305 e 9325, e 12 nas cepas 7108 e 9325. Quinze peptídeos foram expressos exclusivamente por *S. saprophyticus* 9325, 21 pelo ATCC 15305 e 36 pela cepa 7108. Os três cepas secretaram moléculas com função biológica relacionada à via glicolítica, como a triose-fosfato isomerase (TPI), enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e frutose-bifosfato aldolase, moléculas claramente envolvidas em processos extracelulares de outros organismos patogênicos, conhecidas como proteínas “*moonlighting*”. Proteínas envolvidas na defesa contra o estresse, como a catalase, a alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC), a superóxido dismutase (SOD), também foram detectadas na análise, dentre outras relacionadas à processos metabólicos como fermentação láctica, síntese de parede celular, processamento de proteínas e metabolismo do ferro. O antígeno estafilocócico secretado A (SsaA), uma molécula imunogênica detectada previamente na cepa ATCC 15305, não foi detectada na cepa 7108, dado confirmado por ensaio de Western-blotting. Reações de PCR com *primers* específicos e DNA genômico das 3 cepas e posterior sequenciamento do gene *ssaA*, mostrou que a cepa possui o gene em condições idênticas ao encontrado em *S. saprophyticus* ATCC 15305 e 9325, porém não é capaz de secretar o antígeno para o meio extracelular, nas condições ambientais em estudo. No exoproteoma de *S. saprophyticus* 7108 foi encontrada uma maior quantidade de proteínas exclusivas, incluindo quatro da classe das peptidases, enzimas apontadas muitas vezes como potenciais fatores de virulência bacteriana. Desta forma, as diferenças encontradas no repertório de proteínas extracelulares de 3 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, demonstram uma flexibilidade metabólica utilizada por este uropatógeno em promover a patogênese no trato geniturinário humano.

Palavras-chave: *S. saprophyticus*, infecção urinária, virulência, proteômica, proteínas extracelulares

ABSTRACT

Staphylococcus saprophyticus is a Gram-positive bacterium responsible for genitourinary infections, mainly affecting young sexually active women. Along with *Escherichia coli* is responsible for 90% of infections in fertile women, however, can cause infections in men and women of all ages. The repertoire of proteins secreted by pathogenic microorganisms is used to ensure success in the establishment of infection and persistence in the host. In this sense, this study aimed to comparative characterization of extracellular proteome of 3 clinical strain of *S. saprophyticus*, in order to detect possible differences in the secretion of proteins related to virulence and adaptation of the microorganism. The strains used in the study are called ATCC 15305, 7108 and 9325. Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry in tandem (UPLC-MS^E) have identified a total of 159 proteins. Among them, 44 were found in exoproteome of 3 strain, while 20 only in strains ATCC 15305 and 7108, 11 in ATCC 15305 and 9325, and 12 in 7108 and 9325. Fifteen peptides were expressed exclusively by *S. saprophyticus* 9325, 21 by ATCC 15305 strain and 36 by 7108. The three strain secreted molecules with biological function related to the glycolytic pathway, such as the triosephosphate isomerase (TPI), enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and fructose-bisphosphate aldolase, molecules clearly involved in extracellular processes from other pathogenic organisms, proteins known as "moonlighting". Proteins involved in defense against stress, such as catalase, alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC), superoxide dismutase (SOD), were also detected in the analysis, among others related to metabolic processes such as lactic fermentation, cell wall synthesis, protein processing, and iron metabolism. Staphylococcal secretory antigen A (SsaA), a immunogenic molecule previously detected in ATCC 15305 strain, was not detected in strain 7108, as confirmed by Western-blotting assay. PCR reactions with specific primers and genomic DNA of the 3 strains and subsequent sequencing *ssaA* gene, showed that the strain has the gene under conditions identical to those found in *S. saprophyticus* ATCC 15305 and 9325, but is not able to secrete the antigen into the extracellular milieu, under environmental conditions in study. In exoproteome *S. saprophyticus* 7108 was found to take a greater amount of unique proteins, including four of the class of peptidases, enzymes often identified as potential virulence factors of bacterial. Thus, the differences found in repertoire of extracellular proteins of three clinical strain of *S. saprophyticus*, demonstrate a metabolic flexibility used by this uropathogen to promote pathogenesis in human genitourinary tract.

Keywords: *S. saprophyticus*, urinary tract infection, virulence, proteomics, extracellular proteins

1 INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Staphylococcus*

As bactérias Gram-positivas se destacam por compor em sua parede celular uma camada espessa de peptidoglicano e ácidos teicóicos, diferentemente das Gram-negativas, que contem uma fina camada de peptidoglicano, lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e lipoproteínas. Os cocos Gram-positivos compreendem um grupo diversificado de bactérias. Apresentam algumas características em comum, como a forma esférica e a ausência de endósporo. A presença ou a ausência da atividade enzimática de catalase é um simples teste utilizado para diferenciá-los dos vários gêneros pertencentes a este grupo, como *Micrococcus* e *Streptococcus* (MURRAY, et al., 2009).

O gênero *Staphylococcus* é composto por um grupo de bactérias Gram-positivas que estão amplamente distribuídas no meio ambiente, e colonizam a pele e mucosas de seres humanos, podendo fazer parte da microbiota humana. Porém, o aumento excessivo da população de bactérias no organismo pode ser prejudicial, causando infecções, que podem ter origem através do aumento local ou sistêmico de microrganismos ou na atuação de toxinas e enzimas que atuam facilitando sua aderência celular (MURRAY et al., 2009).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Staphylococcaceae, e a maioria possui diâmetro compreendido entre 0,5 e 1,5 μm . Trata-se de cocos Gram-positivos, catalase positivos, imóveis, aeróbios, podendo ser anaeróbios facultativos, ou seja, apresentam capacidade de fermentar glicose tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. As bactérias deste grupo tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva, de onde deriva o nome *Staphylococcus* (origem grega: *staphylé*: cachos de uvas), porém, em espécimes clínicos, estes podem se apresentar como células únicas, pares ou em cadeias curtas. As colônias geralmente são encontradas com aspecto opaco, de cores que variam desde branco até alaranjado, apresentando crescimento ótimo entre 30 e 37°C (SANTOS, et al., 2007).

O gênero consiste atualmente (2016), de acordo com a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, na citação de 49 espécies e 26 subespécies. No geral, o DNA das bactérias do gênero *Staphylococcus* possui um baixo percentual de citosina e guanina (C+G), por volta de 30-39 % (SCHLEIFER & KLOOS, 1975). Outro critério genético conhecido para a inclusão de uma espécie ao gênero *Staphylococcus* é

baseado na árvore filogenética construída pela comparação das sequências do rRNA 16S e rRNA 23S (LUDWIG & KLENK, 2001). Woese, em 1987, demonstrou que a filogenia do rRNA 16S é extremamente útil na classificação de bactérias em espécies, gêneros e famílias.

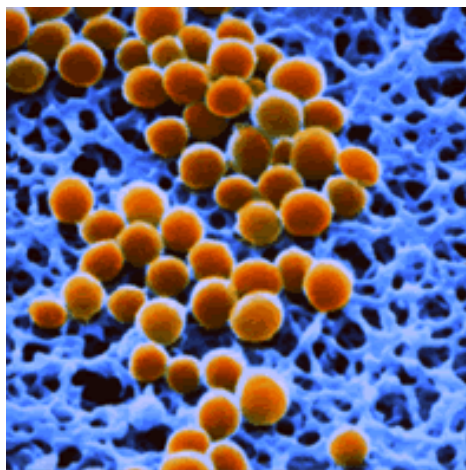


Figura 1. Morfologia das bactérias do gênero *Staphylococcus* (JUNG, et al.; 2010).

Os estafilococos são capazes de se adaptar a qualquer meio, e compõem principalmente, a pele de seres humanos. Eles também podem ser encontrados no trato geniturinário e gastrointestinal, sendo considerados importantes patógenos, por serem capazes de causar um amplo espectro de doenças sistêmicas que ameaçam a vida, incluindo infecções de pele, tecidos moles, ossos, trato urinário, bem como infecções oportunistas (SANTOS, et al., 2007; MARTINS, 2009).

Alguns estafilococos patogênicos podem produzir a coagulase, enzima capaz de coagular o plasma, sendo considerado um potencial fator de virulência destes microrganismos. Desta maneira, a produção ou não desta enzima caracteriza dois grupos distintos de estafilococos: estafilococos coagulase positivos (SCP), e estafilococos coagulase negativos (SCN) (BECKER, et al., 2014).

Entre as espécies coagulase positivas, *Staphylococcus aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, responsável por grande parte de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, sendo, portanto, a espécie mais conhecida e extensivamente estudada. É encontrado, principalmente, na pele e em vias aéreas anteriores de seres humanos e a resistência a antimicrobianos tem sido responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade hospitalares. Por exemplo, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) se destaca por produzir infecções graves tanto em pacientes

hospitalizados como em pacientes da comunidade (SANTOS et al., 2007; OHLSEN & LORENZ, 2010). A resistência à meticilina ou oxacilina é carregada por meio do cassete cromossômico *SCCmecA*, em cepas de *S. aureus*, e é principalmente dependente do produto do gene *mecA*, uma proteína de ligação à penicilina, responsável pela baixa afinidade por antimicrobianos β -lactâmicos (MONTEIRO, et al., 2012). Cepas emergentes de *S. aureus* com resistência intermediária (VISA) e resistência completa à vancomicina (VRSA) também têm sido encontradas e cada vez mais temidas, já que este é o antibiótico de escolha no tratamento de infecções por MRSA (MIMICA & BEREZIN, 2006; MUTHUKRISHNAN, et al., 2011).

Espécies coagulase negativas são isoladas com frequência em laboratórios de microbiologia, sendo consideradas como importantes causas de infecção, particularmente no ambiente hospitalar, em pacientes imunocomprometidos, ou portadores de corpos estranhos (BECKER, et al., 2014). No entanto, o seu significado clínico em muitas situações ainda é difícil de estabelecer, pois eles podem ser patógenos comensais ou invasores. Entre as infecções causadas por SCN, temos bacteremias, endocardites, meningites, peritonites, osteomielites, artrites, infecções do trato geniturinário, e doenças relacionadas com a inserção corporal de cateteres ou próteses (BECKER, et al., 2014; MARTINS, 2009; PRIYA et al., 2014). As espécies mais envolvidas em doenças humanas incluem: *Staphylococcus epidermidis*, e *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, considerados patógenos oportunistas frequentes, atingindo juntos cerca de 80% dos casos de infecções por estafilococos (CRISTINO, 2000; FARIÑA, et al., 2013).

S. saprophyticus, é um SCN que está associado com infecções do trato urinário (ITU) e tem sido considerado o segundo agente causador de infecções adquiridas na comunidade, atrás de *Escherichia coli*, sendo responsável por cerca de 40% das infecções ocorridas em mulheres jovens, levando a casos infecções recorrentes em cerca de 10-15% das mulheres infectadas (FERREIRA et al., 2012; KING et al., 2012; LEE, et al., 2013).

1.2 *Staphylococcus saprophyticus*

Até o início anos 1960, SCN haviam sido considerados apenas como contaminantes da urina, já que estes compõem a microbiota da pele e mucosa geniturinária de seres humanos (ISHIHARA, et al., 2001). Foi em 1962 que Pereira relatou o isolamento de estafilococos coagulase-negativa a partir da urina de mulheres com ITU aguda. Assim,

nos anos seguintes o organismo, antes classificado no grupo dos *Micrococcus*, foi então denominado *S. saprophyticus* (RAZ, et al., 2005).

S. saprophyticus, é um SCN, que está intimamente associado com ITU sem complicação em seres humanos, ou seja, acomete pacientes não hospitalizados, com trato urinário apresentando estruturas e funções normais, e está relacionado principalmente com a ocorrência de cistites em mulheres jovens (HEILBERG & SCHOR, 2003; ORDEN-MARTÍNEZ, et al., 2008; TRIVEDI et al, 2015). O microrganismo tem apresentado importância especial na infecção de mulheres sexualmente ativas, representando mais de 40% da ITU neste grupo (RAZ, et al., 2005; KING, et, al., 2012; FERREIRA, et al., 2012), embora, também existem casos relatados de ITU em homens e mulheres de todas as idades (BECKER, et al., 2014). A infecção causada por *S. saprophyticus* compartilha muitas características clínicas da infecção causada por *E. coli*, mas difere na patogênese/patogenia, ou seja, nos eventos disparados a partir do contato com o patógeno, até a manifestação da doença, na variação sazonal e na distribuição geográfica (RAZ, et al., 2005).

Pertencente ao Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Bacillales e família *Staphylococcaceae*, a cepa ATCC 15305 (*American Type Culture Collection*) de *S. saprophyticus* teve seu genoma sequenciado em 2005 por Kuroda e colaboradores, fornecendo assim uma ampla oportunidade de estudo neste organismo. Na ocasião, Kuroda e colaboradores mostraram que *S. saprophyticus* ATCC 15305 apresenta um genoma contendo 2.516.575 pares de base, com percentual de C+G de 33,2%, comum aos estafilococos. Mostraram também que *S. saprophyticus* contém vários elementos móveis, como dois cassetes cromossômicos denominados de $SCC_{15305cap}$ e $SCC_{15305RM}$ e dois plasmídeos pSSP1 e pSSP2.

1.2.1 Epidemiologia e relevância clínica de *S. saprophyticus*

ITU é uma fonte universal de morbidade humana, com milhões de casos cistite e pielonefrite relatados anualmente. Estima-se que 40 - 50% de todas as mulheres terão pelo menos uma ITU em sua vida, e uma em cada três mulheres já tiveram pelo menos um diagnóstico clínico de ITU até a idade de 24 anos (KING, et, al., 2012). 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, 2013). Dentre as bactérias causadoras de ITU, temos as

Gram-negativas *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e as Gram-positivas *S. saprophyticus* e *Enterococcus faecalis* (LO, et al., 2015).

S. saprophyticus está amplamente distribuído no ecossistema, tornando comum a contaminação de uma variedade de alimentos. O trato gastrointestinal é o principal reservatório de *S. saprophyticus*, sendo que a colonização da uretra, reto e vagina está intimamente relacionada a infecções urinárias (ORDEN-MARTÍNEZ, et al., 2008). O meio mais comum de colonização gástrica é através do contato direto com animais contaminados, ou através da ingestão alimentos cárneos mal cozidos (RAZ, et al., 2005).

S. saprophyticus tem se apresentado como segundo agente causador de ITU descomplicada em mulheres, podendo causar complicações severas como pielonefrite, septicemia, nefrolitíase e endocardite (RAZ et al., 2005). Junto com *E. coli*, é responsável por 90% das ITU em mulheres em idade fértil (GUPTA, et al., 1999). Embora infecções por *S. saprophyticus* tenham sido encontradas principalmente em mulheres jovens sexualmente ativas, casos também foram reportados em pacientes pediátricos. Um estudo retrospectivo realizado por Lo e colaboradores em 2015, mostrou elevada incidência (24,5 %) de ITU por *S. saprophyticus*, em adolescentes entre 12 e 15 anos, em atendimento hospitalar emergencial no Japão. A taxa de incidência maior é encontrada na faixa etária dos 16 aos 25 anos, chegando a 42,5 % em estudo realizado por Wallmark e colaboradores (1978).

A incidência elevada em mulheres jovens pode ser compreendida pelas mudanças hormonais comuns da fase reprodutiva, e foi associada inclusive a relação sexual recente. Mudanças na microbiota vaginal por meio de infecções por *Candida spp.* ou por espermicidas presentes no preservativo, também podem estimular a colonização por *S. saprophyticus* em mulheres (RAZ, et al., 2005). Um estudo retrospectivo em um laboratório da Espanha pôde constatar 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 (ORDEN-MARTÍNEZ, et al., 2008).

S. saprophyticus também é capaz de infectar homens em todas as faixas etárias, podendo causar uretrite, prostatite, epididimite e nefrolitíase neste grupo. O microrganismo já foi isolado em homens jovens e homossexuais, devido à capacidade de colonização retal, sendo raramente encontrado em pacientes hospitalizados. Infecções por *S. saprophyticus* também estão relacionadas a mudanças sazonais ocorridas no final do verão e outono, sendo esta época comum o aumento dos casos de gastroenterite, favorecendo então a

colonização intestinal (RAZ et al., 2005), embora um estudo espanhol tenha relacionado a incidência de infecções principalmente nos meses de primavera e outono europeus (ORDEN-MARTÍNEZ, 2008).

A infecção de *S. saprophyticus* em idosos é pouco comum, já que infecções urinárias neste grupo normalmente estão associadas à inserção de cateteres uretrais ou outras manipulações do trato geniturinário, sendo mais comum, portanto, o isolamento de outros SCN nestes pacientes, como *S. epidermidis* (RAZ, et al., 2005).

ITUs causados por *S. saprophyticus* tem apresentado grande importância clínica por se tratar de infecções recorrentes e sintomas comuns da inflamação do trato inferior, como hematúria e piúria, presença de sangue e leucócitos degenerados na urina, respectivamente, foram vistos com mais frequência entre os pacientes. Além disso, *S. saprophyticus* foi relatado como causa de 13% das infecções do trato urinário superior, uma incidência mais elevada do que infecções por outras bactérias. Já foi mostrado também que pacientes infectados por *S. saprophyticus*, queixaram-se mais de disúria (ardor ao urinar), frequência urinária, e dor nas costas do que indivíduos infectados com *E. coli*. Casos de cálculos renais e uretrais também foram associados com infecções causadas por *S. saprophyticus* (RAZ, et al., 2005; PARK, et al., 2010).

O tratamento de infecções causadas por *S. saprophyticus* inicialmente é realizado por meio de agentes antimicrobianos comumente utilizados para tratar ITUs, com exceção do ácido nalidíxico e fosfomicina. (ORDEN-MARTÍNEZ, et al., 2008). Porém, com o passar dos anos, tem aparecido cepas resistentes a outros antibióticos, como cefixima e eritromicina (ISHIHARA, et al., 2001; ORDEN-MARTÍNEZ, et al., 2008). Isolados de *S. saprophyticus* resistentes à metilina carreadoras do gene *mecA*, responsável pela resistência à antimicrobianos β -lactâmicos, já foram descritos no Japão e Suécia. Apesar de serem casos de ocorrência isolada, o desenvolvimento de novos estudos é necessário para o monitoramento de futuras cepas multirresistentes de *S. saprophyticus* (HIGASHIDE, et al., 2008, SODERQUIST & BERGLUND, 2009).

1.2.2 Diagnóstico laboratorial

Para a realização do diagnóstico de ITUs, além da quantificação de bactérias na urina, elementos celulares presentes na urina, o método de coleta utilizado e o quadro clínico do paciente são fatores que também devem ser levados em consideração (ANDREU, et al., 2011). O diagnóstico das infecções estafilocócicas é realizado por meio

do isolamento, através de meios de cultura comum, seletivo e diferencial indicador, como ágar sangue e manitol salgado, e da caracterização através de testes bioquímicos, como o teste da catalase e o teste da coagulase (ANVISA, 2004).

A identificação de *S. saprophyticus* em amostras de urina é realizada basicamente através da análise da resistência à novibiocina, ausência de hemolisina e coagulase. Este modo de rastreamento é considerado altamente sensível e específico, já que é capaz de diferenciá-lo dos outros SCN de importância clínica. Porém, testes comerciais adicionais podem ser necessários para o diagnóstico confirmatório. Morfologicamente, as colônias de *S. saprophyticus* são circulares, grandes, convexas e hiperpigmentadas, após crescimento em placa por 24 horas. Cerca de 65% das colônias apresentam cor amarelada, e 35% são esbranquiçadas (HEILBERG & SHOR, 2003; RAZ, et al., 2005; FARIÑA, et al., 2013).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E ADAPTAÇÃO DE *S. saprophyticus*

Muitas das bactérias Gram-positivas estão amplamente distribuídas no meio ambiente, podendo ser encontradas no ambiente ou na pele, mucosas e em outros locais corpóreos dos seres humanos como parte da microbiota. Em condições homeostáticas, essas bactérias estabelecem uma relação harmônica com o sistema imune, competindo por substrato com bactérias oportunistas e evitando a proliferação destas (MURRAY, et al., 2009).

Entretanto, o elevado aumento da população de bactérias que compõem a microbiota do corpo pode ser prejudicial, causando infecções. Estas infecções normalmente são causadas pela multiplicação local e sistêmica de bactérias, bem como pela ação patogênica de exotoxinas ou moléculas que atuam facilitando a aderência celular desses microrganismos (MURRAY, et al., 2009).

A patogênese das infecções por estafilococos consiste na capacidade da bactéria em modular estratégias que permitem adesão, agressão, invasão, persistência e evasão imune no hospedeiro (BECKER, et al., 2014). Esses mecanismos são denominados de fatores de virulência e estão relacionados à capacidade do organismo em invadir e se multiplicar em um hospedeiro, causando doença. Os principais fatores de virulência descritos em *S. aureus*, um SCP, são componentes de superfície celular e toxinas. Algumas enzimas também têm sido consideradas fatores de virulência nesta espécie de estafilococo (KIM, et al., 2012; ZECCONI & SCALI, 2013; GRUMANN, et al., 2014). Dentre os

fatores de virulência encontrados em SCN, incluem-se várias enzimas extracelulares, como lipases e proteases. A capacidade de formação de biofilme por alguns SCN, característica responsável pela resistência a antibióticos e proteção a ataques pelo sistema imune do hospedeiro, também é devido à atuação de proteínas extracelulares (OTTO, 2009).

O conhecimento dos mecanismos de virulência de *S. saprophyticus* começou a ser elucidado recentemente, através, principalmente, de abordagens proteômicas, porém, ainda não estão claramente elucidados. Um dos primeiros fatores de virulência encontrado em *S. saprophyticus* foi a enzima urease, um complexo enzimático composto por 3 unidades, capaz de converter ureia em amônia e dióxido de carbono, facilitando a disseminação e a invasão de bexiga e rim de pacientes infectados (GATERMANN et al., 1989b; KLINE, et al., 2010). A presença de amônia na urina aumenta o pH local, que normalmente se encontra entre os pHs 5 e 6, levando a precipitação de sais e formação de pedras urinárias. Desta maneira, ao atingir o trato urinário, o microrganismo produz urease como mecanismo de adaptação, tornando o pH alcalino como uma característica comum da urina de pacientes infectados por *S. saprophyticus* (LOES et al., 2014).

A capacidade de aderência a proteínas da matriz extracelular ou a células uroepiteliais é um passo fundamental na colonização de bactérias causadoras de ITUs. Proteínas de superfície de *S. saprophyticus* também se mostraram como prováveis fatores de virulência, estando envolvidas, principalmente, num passo crucial do processo de colonização do hospedeiro: a adesão (SANKIÇ, et al., 2006; KLEINE, et al., 2015).

Ssp (proteína associada à superfície de *S. saprophyticus*) e Aas (autolisina/adesina de *S. saprophyticus*) são duas proteínas associadas à superfície não covalentemente, que podem desempenhar papel importante na virulência de *S. saprophyticus* (KING, et al., 2012). A Ssp é uma adesina descrita em *S. saprophyticus*, presente em grandes quantidades na superfície, o qual foi observada inicialmente nas cepas 7108 e CCM83 (GATERMANN, et al., 1992). Mais tarde ela foi caracterizada nas cepas 7108 e 9325, como uma proteína com atividade de lipase, encontrada na maioria das cepas de *S. saprophyticus* (SANKIÇ, et al., 2005). A Aas é considerada uma proteína multifuncional que se liga a fibronectina, capaz de aglutinar eritrócitos de carneiro e se comportar como uma autolisina durante a divisão celular (SANKIÇ, et al., 2006; HENDERSON & MARTIN, 2011; KLEINE, et al., 2015).

Outra adesina encontrada é a hemaglutinina denominada UafA (fator de uroaderência A), uma proteína ancorada à parede celular que pode atuar facilitando a aderência do patógeno a células da bexiga e vesícula biliar, considerada assim como um

componente de superfície microbiana reconhecadora de moléculas da matriz adesiva (MSCRAMMS) (GATERMANN, 1986; KURODA, et al., 2005, MATSUOKA, et al., 2011). Kuroda e colaboradores notaram hemaglutinação e adesão reduzidas a células humanas de carcinoma de bexiga, em condições de deleção do gene *uafA* em *S. saprophyticus* ATCC 15305. Recentemente o UafB (fator de uro-aderência B), uma adesina rica em serina, foi mostrado na cepa MS1146, como um fator ligante de fibronectina, fibrinogênio e células endoteliais da bexiga. Estes dois fatores apresentam capacidade de hemaglutinação, sendo este um mecanismo utilizado pela bactéria para facilitar a sua aderência à mucosa geniturinária humana (KING et al., 2011).

A SdrI (*Serine-Aspartate Repeat Protein I*) é uma molécula adesiva que foi caracterizada na cepa 7108, como proteína ligante de colágeno tipo I, homóloga à proteínas adesivas Sdr de *S. aureus* e *S. epidermidis* (SAKINC, et al., 2006; KLEINE, et al., 2010; KLINE, et al., 2010). Em 2015, Kleine e colaboradores demonstraram, por meio de um modelo murino, que SdrI pode estar envolvida na hidrofobicidade da superfície celular de *S. saprophyticus*, característica que acredita-se estar relacionado à capacidade de aderência à células do epitélio urinário.

Dentre outros fatores putativos de virulência de *S. saprophyticus*, temos os ácidos lipoteicóicos, que também podem agir como adesinas durante processo infeccioso (TETI, et al., 1987), e a enzima D -serina desaminase (DsdA), que tem se mostrado como um potencial fator de virulência de *S. saprophyticus* em modelo murino. O estudo apontou a capacidade do patógeno em utilizar a D -serina presente na urina como fonte única de carbono, indicando um mecanismo essencial de crescimento no hospedeiro (KORTEBERWANGER, et al., 2013).

A proteína sssF (proteína de superfície de *S. saprophyticus* F), pertencente à um grupo de proteínas altamente conservado nos estafilococos, foi recém descrita nas cepas ATCC 15305 e MS1146, como um fator crucial na proteção do microrganismo contra o ácido graxo linoleico, elemento integrante do sistema imune inato de seres humanos de ação bactericida (KING, et al., 2012).

Com o sequenciamento do genoma de *S. saprophyticus* cepa ATCC 15305, Kuroda e colaboradores revelaram um cassete cromossômico esfilocócico responsável pela síntese de uma cápsula polissacarídica (CP), denominado SCC_{15305cap}. Em 2010, Park e colaboradores mostraram que cepas de *S. saprophyticus* encapsuladas eram capazes de escapar da opsonização fagocítica e resistir à morte mediada pelo sistema complemento, enquanto que os mutantes acapsulados foram sensíveis à morte por neutrófilos humanos.

Notaram também que apenas algumas das cepas clínicas em estudo eram providas de CP, apresentando então, a CP de *S. saprophyticus* como um fator de virulência determinante deste patógeno.

De modo geral, as moléculas citadas contribuem para a adesão, e possível internalização do microrganismo a células uro-epiteliais, como visto em *E. coli*. A internalização da bactéria permite a persistência da infecção no trato geniturinário, pois dentro da célula, o patógeno está protegido de ataques causados por antibióticos e defesas imune do hospedeiro (SZABADOS, et al., 2008).

Desta forma, o sucesso patogênico de *S. saprophyticus* se deve principalmente por sua capacidade de aderir persistentemente ao trato urinário, associado à secreção de urease, um importante fator de virulência em ITUs. A urease está intimamente relacionada ao crescimento e à invasão persistente de bactérias na bexiga, sendo um fator uropatogênico associado à formação de cálculos renais em casos de infecções causadas também por outros patógenos, como *Klebsiella spp.* (KURODA, et al., 2005).

Porém, apesar dos fatores de virulência já mostrados em *S. saprophyticus*, estudos de grande escala neste modelo ainda são necessários. Kuroda e colaboradores, na ocasião do sequenciamento completo do genoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305, mostrou que mesmo pertencendo ao mesmo gênero, ao comparar o genoma de *S. saprophyticus* com o de *S. epidermidis* e *S. aureus*, foram encontrados 582 (23,8%) ORFs (*Open Reading Frame*) específicas de *S. saprophyticus*. Desta maneira então, tanto o quadro de proteínas de superfície, como o arsenal de moléculas secretadas de *S. saprophyticus* tendem a apresentar diferenças, se comparado a outras espécies do grupo.

1.4 PROTEÍNAS EXTRACELULARES E VIRULÊNCIA

O exoproteoma constitui aproximadamente 30% do total de proteínas de um organismo, englobando assim um conjunto de proteínas secretadas para o meio extracelular, com funções diversas, como toxinas, quimiocinas, enzimas, anticorpos e hormônios (RANGANATHAN & GARG, 2009). A secreção de proteínas em bactérias é uma reação multifásica, capaz de sofrer alteração por meio de estímulos externos, sendo considerada fundamental na síntese de membrana e parede celular, garantindo assim a viabilidade celular bacteriana (ECONOMOU, 2002).

Em geral, o microrganismo patogênico é capaz de secretar um repertório de proteínas, dentre elas, aquelas responsáveis pela capacidade do organismo de se

desenvolver no hospedeiro, definindo então a sua capacidade de adesão e disseminação durante um processo infeccioso (LEE & SHNEEWIND, 2001; ABBY, et al., 2016). Desta forma, as proteínas extracelulares de microrganismos infecciosos tem se mostrado como importantes fatores de virulência e adaptação, sendo muito úteis no estudo da interação parasito-hospedeiro. Dentre as funções dessas proteínas, se destacam as relacionadas à proteção do microrganismo contra o estresse oxidativo e à opsonização fagocítica por células imunes do hospedeiro (LEE & SHNEEWIND, 2001).

De acordo com Lee e Shneewind, o principal mecanismo bacteriano de invasão ao hospedeiro, consiste na capacidade do microrganismo em aderir a células do hospedeiro e secretar toxinas e fatores de virulência durante disseminação, garantindo assim sucesso no estabelecimento da infecção e persistência no hospedeiro, nas diversas condições ambientais. Além do mais, proteínas extracelulares de patógenos intracelulares estão expostas ao sistema imune do hospedeiro, sendo consideradas, portanto, os primeiros alvos antigênicos a desencadear uma resposta imunitária no hospedeiro (MARIAPPAN, et al., 2009).

Um dos primeiros trabalhos que mostrou a relevância clínica das proteínas extracelulares dos estafilococos foi realizado em 1930 por Jordan e colaboradores, após perceberem que o filtrado do sobrenadante de cultura de *Staphylococcus spp.* era capaz de desencadear sintomas de intoxicação alimentar em humanos. Mais tarde, Schlievert e colaboradores conseguiram associar a secreção de toxina por *S. aureus* a uma síndrome semelhante à vista nos casos de sepse, caracterizando então a Síndrome do Choque Tóxico (TSS).

A maior parte dos fatores de virulência de *S. aureus* é considerada proteínas secretadas, as quais podem ser adesinas, responsáveis pela aderência do microrganismo ao hospedeiro, exotoxinas e enzimas com a função de facilitar a evasão ao sistema imune e disseminação celular (KUSCH & ENGELMANN, 2014). Um exemplo são os superantígenos secretados por *S. aureus*, moléculas consideradas como responsáveis pelos sintomas severos da TSS (SCHLIEVERT et al., 1981). Kusch e Engelmann acreditam que as proteínas secretadas por *S. aureus* apresentam-se como um potencial reservatório de novos mecanismos de virulência.

Recentemente Stemerding e colaboradores (2013) descreveram uma nova função para as proteínas extracelulares de *S. aureus*. Por meio da secreção de moléculas imunomoduladoras, como a FLIPr, *S. aureus* foi capaz de escapar da fagocitose por neutrófilos em modelo de infecção *ex vivo*. A capacidade de escape ao sistema imune

confere ao microrganismo patogênico a habilidade de sobreviver no hospedeiro e estabelecer infecção (STEMERDING, et al., 2013).

Em estudo pioneiro, nosso grupo recentemente identificou proteínas presentes no exoproteoma de *S. saprophyticus*. Algumas das proteínas identificadas foram capazes de incitar a uma resposta imune humoral em camundongos Balb/c, como por exemplo, o antígeno imunodominante A (IsaA), o antígeno estafilocócico secretado A (SsaA), e a enolase, caracterizadas então como proteínas imunogênicas (OLIVEIRA, 2014). Essas três proteínas já foram identificadas e caracterizadas em outras bactérias do gênero, as quais se apresentaram como potenciais fatores de virulência (LANG et al., 2000; CARNEIRO et al., 2004; LORENZ et al., 2011).

1.5 O ESTUDO DOS PROTEOMAS

Os dados disponibilizados pelo sequenciamento de genomas são limitados, se não complementados com técnicas mais abrangentes e específicas, que sejam capazes de analisar tanto as etapas de transcrição de genes, como os produtos produzidos por eles, as proteínas. Como sabemos, o processo de expressão gênica apresenta inúmeros níveis de regulação, até chegar ao produto final (JAMESDANIEL, et al., 2009). Assim, o estudo de sequências gênicas por só si não oferecem informações completas quanto à biologia de organismos importantes.

Desta maneira, na Era Pós-Genômica, novos termos foram surgindo, na intenção de nomear as diversas possibilidades de estudos permitidos após a disponibilidade dos genomas. O transcriptoma, a proteômica e a metabolômica, por exemplo, diz respeito ao estudo de transcritos, proteínas e metabólitos produzidos, por um determinado organismo (OTTO, et al., 2012).

O número rapidamente crescente de genomas sequenciados tem fornecido uma grande oportunidade para o estudo de seus proteomas (SONG, et al., 2009). A expressão proteoma foi citada pela primeira vez em 1996, com a finalidade de denominar o conjunto de proteínas expressas por um organismo, surgindo assim a termo proteômica como o estudo dos proteomas (NEIDHARDT, 2011; MONTEIRO, et al., 2012).

O estudo dos proteomas consiste, portanto, na análise da expressão de um grupo de genes e das proteínas produzidas, após modificações pós-traducionais, as quais ocorrem em resposta a determinadas condições ambientais (DOMON & AEBERSOLD, 2010). Diferentemente do genoma, que é menos flexível, o proteoma é altamente dinâmico,

permitindo então, além da identificação de proteínas, o estudo das modificações, das interações proteína-proteína e dos perfis de expressão sob condições previamente definidas (MONTEIRO, et al., 2012; BASELL, et al., 2014).

Assim, a proteômica contribui com análises em larga-escala que visa revelar, de forma completa e abrangente, o perfil de proteínas expressas por um organismo, fornecendo então, uma visão de sua estrutura, regulação e função nos sistemas biológicos (DOMON & AEBERSOLD, 2010). Junto com a bioinformática, a proteômica é considerada uma importante etapa na elucidação das estratégias utilizadas por microrganismos infecciosos para colonizar o hospedeiro humano (MONTEIRO, et al., 2012).

Desta forma, a análise dos proteomas tem sido muito utilizada no estudo da interação patógeno-hospedeiro, desmascarando a fisiopatologia das principais infecções que acometem o ser humano. Por exemplo, Pigosso e colaboradores em 2013 foram capazes de caracterizar, por meio da eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e espectrometria de massas, diferenças metabólicas entre diversas espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*. Outro estudo realizado por Parente-Rocha e colaboradores em 2015, foi capaz de avaliar a resposta proteômica de *Paracoccidioides brasiliensis* durante internalização em macrófagos.

Hoje se sabe que as proteínas desempenham papel fundamental no estabelecimento e persistência de infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, atuando na maquinaria da produção de biofilme, na aderência celular, no metabolismo, e a agindo também como enzimas e toxinas, entre outras funções. Assim, as ferramentas da proteômica têm sido consideradas poderosas na investigação da patogênese de infecções estafilocócicas, tornando as moléculas proteicas alvos potenciais para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, antibióticos e vacinas (BROKER & BELKUM, 2011; OTTO, et al., 2014).

Em *S. aureus*, encontram-se inúmeros estudos, sob diversas condições, relacionados à caracterização de proteínas em larga-escala, utilizando a proteômica (BROKER & BELKUM, 2011). Podemos citar o estudo realizado por Kim e colaboradores, em 2014, que caracterizou a proteína estafilocócica A (Spa) de *S. aureus*, e observou que este peptídeo de parede celular é capaz de produzir elevados índices de anticorpos após inoculação em modelo animal, apresentando-se então como um alvo potencial no desenvolvimento de vacinas e imunoterapias anti-estafilocócicas.

A literatura também apresenta diversos estudos de proteômica comparativa,

que visam à análise da virulência de agentes patogênicos. Dentre eles, temos o trabalho de Siljamaki e colaboradores em 2014, que caracterizaram o perfil do surfacoma de 2 cepas de *S. epidermidis* provindos de infecções em humanos e bois, e foi capaz de relacionar a expressão diferencial de proteínas adesinas e lipases entre os isolados, com as características fenotípicas de cada um (SILJAMAKI, et al., 2014B). A análise comparativa do exoproteoma realizado por Siljamaki e colaboradores, como os mesmos isolados de *S. epidermidis* e mais a cepa RP62A associada à sepse bacteriana, revelou diferenças cepa-específicas na secreção de adesinas e antígenos, e um perfil proteômico com mais proteínas relacionadas à virulência, na cepa de *S. epidermidis* envolvida em casos de sepse (SILJAMAKI, et al., 2014A).

Em 2016, Bonar e colaboradores seguiram a mesma linha de pesquisa, ao avaliar, as proteínas extracelulares de isolados de *S. aureus* com fenótipos altamente virulentos em comparação às cepas não virulentas. Com a análise, Bonar e colaboradores puderam prever uma identidade genética de cada cepa. As alfa-hemolisinas (HLA) e as autolisinas bifuncionais (ATL) foram apontadas como indicadores de virulência, assim como a glutamilpeptidase foi relacionada à característica não virulenta de *S. aureus*.

O sequenciamento completo do genoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 revelou um genoma composto por 2.516.575 pares de base, como já mencionado. A comparação com o genoma de outras espécies de *Staphylococcus* forneceram informações sobre a especialidade de *S. saprophyticus* em estar envolvido exclusivamente em infecções do trato urinário, e não em infecções graves como as causadas por *S. aureus*. Por exemplo, o genoma de *S. saprophyticus* apresentou inúmeras ORF's envolvidas em sistemas de transporte e regulação, porém ORF's relacionadas a compostos celulares e virulência foram poucas em comparação com *S. aureus* e *S. epidermidis*. Por sua vez, os sistemas de transportes encontradas em *S. saprophyticus* estavam relacionados ao transporte de íons contidos na urina (KURODA, et. al., 2005). Diante desses dados, as ferramentas da proteômica podem claramente auxiliar na elucidação de diferenças existentes entre isolados bacterianos, apontando características que podem, inclusive, provocar variações no grau de patogenicidade dentro da espécie.

Diante disto, destacamos a importância da análise global e comparativa de proteínas no estudo da virulência e patogenia de microrganismos infecciosos, como *S. saprophyticus*.

2 JUSTIFICATIVA

S. saprophyticus é um dos principais agentes causadores de ITU adquirida na comunidade, acometendo principalmente mulheres jovens sexualmente ativas. Junto com *E. coli*, é responsável por 90% das infecções em mulheres férteis. Além de causar infecções recorrentes, *S. saprophyticus*, pode funcionar como repositório de genes importantes para conferir resistência a antibióticos, podendo repassá-los a outras espécies de bactérias. Desta maneira, *S. saprophyticus*, tem apresentado elevada importância clínica e merece atenção especial por se tratar de um organismo ainda pouco estudado.

Utilizada em estudos com *S. aureus*, a proteômica de larga-escala tem contribuído cada vez mais na identificação de moléculas importantes pelo sucesso patogênico de diversos organismos, como também na explicação dos mecanismos de invasão e disseminação utilizados por microrganismos patogênicos em geral. Associado a análises de fatores extracelulares, como as proteínas secretadas, esta ferramenta torna-se imprescindível no estudo das interações entre patógeno e hospedeiro.

Com o sequenciamento do genoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 em 2005, surgiu-se então a possibilidade de uma análise mais aprofundada deste patógeno, por meio de ferramentas da proteômica. Assim, o conhecimento dos fatores de virulência utilizados por diferentes cepas de *S. saprophyticus* se faz necessário para uma melhor compreensão da patogênese deste microrganismo. O presente trabalho visa contribuir na elucidação destes mecanismos, através da identificação e comparação do perfil do proteoma extracelular de três cepas deste modelo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Comparação do exoproteoma de 3 cepas clínicas *S. saprophyticus*, com a finalidade de detectar diferenças na secreção de potenciais proteínas envolvidas na virulência e adaptação do microrganismo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos proteicos secretados pelas cepas ATCC 15305, 7108 e 9325 de *S. saprophyticus*;
- Avaliar presença de lise celular em sobrenadante de cultura;
- Identificar proteínas secretadas pelas cepas de *S. saprophyticus*;
- Comparar o perfil de expressão das proteínas extracelulares de *S. saprophyticus* nas diferentes cepas em estudo;
- Validar os dados proteômicos obtidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE *S. saprophyticus*

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas 3 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, denominados ATCC 15305, 7108 e 9325, estocados em glicerol à -80°C. O cultivo em placa do microrganismo foi realizado em ágar BHI (*brain heart infusion*), preparado de acordo com as especificações do fabricante (*Sigma-Aldrich*). Após a obtenção de colônias isoladas de *S. saprophyticus*, aproximadamente 3 colônias foram inoculadas em meio de cultura BHI líquido e mantidas em agitador por 16 horas a 37°C. Após esse período, as células de *S. saprophyticus* foram obtidas por centrifugação a 2400 g por 10 minutos, as quais foram transferidas para um novo meio contendo 400 ml de BHI, e incubadas por 1, 3 e 6 horas sob agitação à 37°C. O sobrenadante de cultura, contendo as proteínas secretadas, foi então coletado após o período de incubação.

4.2 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *S. saprophyticus*

Após o cultivo, o meio de cultura foi centrifugado a 2400 g por 10 minutos, e o sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,22 µm (*Millipore*®). Para a obtenção de proteínas através do método de precipitação isoelétrica, o sobrenadante foi então tratado com ácido tricloroacético (TCA) (*Sigma-Aldrich*) à concentração final de 10% e incubado por 16 horas a 4°C (RAJALINGAM, et. al., 2009; QUIBLIER, et. al., 2013). Um precipitado de proteína foi obtido através da centrifugação do sobrenadante tratado, por 1h a 3000 g a 4°C. O precipitado foi lavado 3 vezes com acetona gelada (4°C) (*Sigma-Aldrich*) e concentrado em tampão bicarbonato de amônio a 50mM (*Sigma-Aldrich*), pH 8,5, em dispositivo de ultra-filtração Amicon 10 kDa (*Millipore*®), conforme já padronizado pelo grupo (OLIVEIRA, 2014). Para a realização de ensaio de atividade enzimática, o secretoma extracelular de *S. saprophyticus* foi obtido, após filtração em membrana de 0,22 µm (*Millipore*®), por concentração em dispositivo de ultra-filtração Amicon (*Millipore*®), em tampão Tris Cálcio (Tris HCl 2 mM pH 8,8; CaCl₂ 2mM) até o volume de aproximadamente 1,5 ml, como realizado anteriormente (WEBER, et al., 2012). Após a concentração da amostra, o extrato de proteínas extracelulares adquirido foi dosado pelo método colorimétrico do reagente *Bradford* (Azul Brilhante de *Comassie G-*

250) em plataforma de detecção multimodal *SpectraMax^R Paradigm^R*, a 595 nm (*Molecular Devices*), utilizando soro-albumina bovina (BSA) para a construção da curva padrão (BRADFORD, 1976).

4.3 AVALIAÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) do sobrenadante de cultura de *S. saprophyticus*, foi utilizado DNA genômico como controle. O DNA foi extraído a partir de colônias de *S. saprophyticus* ATCC 15305, após lise celular realizado em dispositivo *Bead Beader (Biospec)*, por meio de pérolas de vidro (*Sigma-Aldrich*), conforme protocolo descrito por Sambrook & Russel em 2001, e quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)*. A partir da coleta de 2 ml do sobrenadante de cultura da cepa ATCC 15305, nos tempos de 1, 3 e 6 horas, reações de PCR foram realizadas, com a finalidade de amplificar um fragmento de 189 pares de base do gene *rpsA* que codifica a proteína ribossomal 30S S1. Os *primers* ou oligonucleotídeos utilizados na reação foram, respectivamente, 30S sentido e antissentido: 5' 'GTCGTAAAGCAGTAGAGGCATT 3' e 5' 'AAACGTGAACAAGTCCATCAAC 3'. As ciclagens foram realizadas em sequências de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e mais uma etapa final de extensão a 72 °C por 4 minutos. As reações foram então visualizadas em gel de agarose a 1%, juntamente com um marcador padrão de DNA (*Genne Rulertm, Thermo Fisher Scientific*), e corados com Gel *Red (Biotium)*, após corrida eletroforética. O nível de sensibilidade da PCR foi analisado através de DNA genômico de *S. saprophyticus* ATCC 15305 nas concentrações de 50 ng a 1 pg.

4.4 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

Com a finalidade de avaliar a qualidade dos extratos proteicos, a integridade das proteínas extraídas foi analisada após separação pela Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 12%. Um volume equivalente a 40 µg de proteína foi solubilizado em tampão de amostra [Tris-HCl 0.2 M pH 6,8, SDS 40% (v/v), beta-mercaptoetanol 20 % (v/v), glicerol 20 % (v/v) e traços de azul de bromofenol], na proporção 1:1 (v/v). Logo depois, a mistura foi aquecida a 100°C

durante 10 minutos, e submetida à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12 % usando um sistema vertical (*GE Healthcare*) e tampão padrão de corrida [Tris Glicina (tris base 0,25 M, glicina 1,92 M e SDS 34 mM)], durante 30 minutos a 80 V seguindo a 120 V até o término da corrida. Um marcador de peso molecular conhecido foi utilizado em cada corrida eletroforética (*GE Healthcare*).

Os géis foram corados com solução de nitrato prata, devido à alta sensibilidade de detecção de proteínas em nano-escala, conforme protocolo descrito anteriormente (adaptado de CHEVALLET, et. al., 2006). Primeiramente o gel obtido após eletroforese unidimensional de proteínas, foi mergulhado em solução de fixação (metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e 180 µL de formaldeído 37%) por 1 hora. Após a incubação, o gel foi lavado três vezes em solução de 50% (v/v) de etanol. A sensibilização do gel foi realizada em solução de tiosulfato de sódio 1,2 mM por 1 minuto e lavado 3 vezes com água destilada. Uma solução impregnante, contendo nitrato de prata 2,9 mM, foi preparado a partir da adição de formaldeído à solução. Após 20 minutos, o gel foi novamente lavado 3x com água destilada, e a solução de revelação (carbonato de cálcio 0,6 M, tiosulfato de sódio usado na sensibilização, e 100 µL de formaldeído 37 %) foi misturada até que as bandas estivessem visíveis. Para a parada da reação, foi utilizada a mesma solução usada na fixação do gel, porém sem a adição de formaldeído. Os géis foram guardados na solução de parada e mantidos refrigerados a 4°C.

4.5 DIGESTÃO POR TRIPSINA E PREPARO DE AMOSTRA PARA nanoUPLC-MS^E

Um volume referente a 500 µg de proteína de cada cepa foi preparado para digestão, como já descrito (BAILÃO et al., 2014; LIMA et al., 2014). As amostras foram tratadas com o surfactante *RapiGest SF* (*Waters Corporation*) (0,2% v/v), incubadas a 80 °C por 15 minutos e em seguida reduzidas com 2,5 ul de ditioneitol (DTT) 100 mM (*GE Healthcare*) a 60 ° C por 30 minutos, para facilitar a alquilação das cisteínas e posterior digestão por tripsina. As amostras foram alquiladas com 2,5 ul de iodoacetamida 300 mM (*GE Healthcare*) e incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos, à temperatura ambiente. A digestão das proteínas ocorreu através da adição de 100 µL de tripsina 50 ng/µL (*Promega*), as quais foram armazenadas a 37 ° C por 16 h. Para a precipitação do surfactante, os peptídeos obtidos foram tratados com 100 µL de solução de ácido trifluoroacético (TFA) (*Sigma-Aldrich*) a 5% e incubados durante 90 minutos a 37 ° C. As

amostras foram centrifugadas a 21000 g por 30 minutos à 6 ° C, e os sobrenadantes transferidos para tubos novos, sendo logo em seguida, desidratados em *speed vacuum* (*Eppendorf*). O precipitado obtido foi suspenso em 30 µL de água ultrapura, e purificado em ponteiras de cromatografia *ZipTips* C18 (*Millipore*). Os peptídeos foram novamente secados em *speed vacuum* e suspensos em 40 µl de solução de formiato de amônio 20 mM, acrescentado de 150 fmol de fosforilase B de coelho (PHB) (*MassPREPTM Digestion Standard, Waters Corporation*), usado então como padrão endógeno, para validar o perfil e a quantificação das proteínas identificadas.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR nanoUPLC-MS^E

Para avaliar o perfil das proteínas secretadas pelas cepas de *S. saprophyticus*, as amostras foram analisadas através da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho em nano-escala associada à Espectrometria de Massas *in tandem* (nanoUPLC-MS^E). Após a digestão, os peptídeos foram separados por UPLC, e analisados em sistema *nanoACQUITY^M* (*Waters Corporation*), equipado com uma pré-coluna *Trap Symmetry* C18 5µm, 180 µm x 20mm, uma coluna *XBridge* C18 5µm, 300µm x 50mm e uma coluna analítica 1,7µm, 100µm x 100mm de fase reversa (RP) (*Waters Corporation*). Os peptídeos sofreram fracionamento com eluição por gradientes crescentes de acetonitrila (ACN), um solvente orgânico miscível em água, sendo eles 11,4%, 14,7%, 17,4%, 20,7% e 50,0%, respectivamente, e os espectros obtidos utilizando *nanoelectrospray* como fonte de ionização (*nanoESI, Waters Corporation*). Os peptídeos foram analisados em triplicata experimental, com três injeções de amostras em cada replicata, conforme já realizado pelo grupo (BAILÃO et al., 2014).

Para validação da identificação de proteínas e da análise do nível de quantificação, as medições de intensidade observadas foram normalizadas com os peptídeos identificados por meio do padrão interno digerido.

4.7 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Os dados obtidos por meio da nanoUPLC-MS^E, foram processados e avaliados utilizando o banco de dados *Protein Lynx Servidor Global* (PLGs) versão 3.0.2 (*Waters Corporation*). Em seguida, os espectros processados foram comparados com sequências proteicas de banco de dados (<http://www.uniprot.org/>), juntamente com sequências

inversas. *Expression^E informatics* versão 3.0.2 foi utilizado para comparações quantitativas adequadas. As proteínas identificadas foram organizadas por algoritmo de expressão, em uma lista estatisticamente significativa, correspondendo a taxas de regulação induzidos e reduzidos, entre as cepas analisadas. O modelo matemático utilizado para calcular as taxas faz parte do algoritmo de Expressão dentro do software PLGs da *Waters Corporation* (GEROMANOS et al., 2009). A taxa de repetição mínima para cada proteína, para a inclusão na análise, foi de 2 em todas as replicatas. As tabelas de peptídeos e proteínas geradas pelo PLGs foram mescladas e a variedade dinâmica do experimento foi calculado utilizando o programa *MassPivot* versão 1.0.1. Assim, as tabelas foram comparadas utilizando o software *Spotfire* versão 8.0, como descrito previamente (MURAD et al., 2011; MURAD & RECH, 2012).

4.8 AVALIAÇÃO DE DNA GENÔMICO POR REAÇÃO EM CADEIA DO POLIMERASE (PCR)

A extração de DNA genômico das 3 cepas de *S. saprophyticus* foi realizada de acordo com o descrito na seção 4.3. Sequências codificadores do antígeno estafilocócico secretado A (SsaA) foram obtidas em banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, número de acesso BAE17758.7) e oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o software *Gene Runner* versão 2.1. Assim, os *primers* ou oligonucleotídeos utilizados na reação foram: sentido 5' GTGGATCCCCGATTCCATGAAAAAATCGCTACAGCT 3' e antissentido 5' GTCGACCCGGGAATTCTTAGTGAATGTAGTTGTAAC 3'. Posteriormente, o fragmento do gene *ssaA*, de tamanho esperado de 726 pb, foi amplificado por PCR, por meio de reações com volume final de 10 µL, utilizando-se 5 µL de *Green Taq Master Mix* (*Promega*), 10 pMol de cada oligonucleotídeo e 50 ng de DNA genômico de *S. saprophyticus*. As ciclagens foram realizadas em termociclador, respeitando as seguintes especificações: 40 ciclos a 94°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 60 segundos, e então finalizadas com uma etapa final de extensão à 72°C por 4 minutos. As reações foram avaliadas em gel de agarose a 1% corados com *Gel Red* (*Biotium*) e submetidos à eletroforese, juntamente com um marcador padrão de DNA (*Gene Rulertm*, *Thermo Fisher Scientific*). A purificação da PCR para posterior sequenciamento gênico foi realizado por meio do kit *QIAquick PCR Purification* (*Qiagen*) e quantificado em *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*).

4.9 SEQUENCIAMENTO GÊNICO DO ANTÍGENO ESTAFILOCÓCICO SECRETADO A (SsaA)

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger utilizando kit comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)*. A reação foi realizada utilizando 300 ng de produto de PCR purificado conforme protocolo descrito na seção 4.7. Foi utilizado 1 μ L de solução Big Dye, 2 μ L de Tampão BD e 2,5 μ M de oligonucleotídeo descritos na seção 4.7 em um volume de 10 μ L de reação. A reação foi realizada em termociclador com 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A reação foi precipitada com a adição de 40 μ L de isopropanol 65% durante 20 minutos à temperatura ambiente, seguida de uma centrifugação por 45 minutos a 2000 g. O sobrenadante foi descartado, a reação foi lavada com 250 μ L de etanol 60% centrifugada por 10 minutos a 2000 g e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi seca à temperatura ambiente, ressuspensa em 10 μ L de Formamida Hi-Di, desnaturada a 95 °C por 5 minutos e injetada em plataforma 3500 XL (*Thermo Fisher Scientific*). As reações foram realizadas em quadruplicata técnica com ambos os oligonucleotídeos. Os dados foram avaliados em pacote Phred/Phrap/Consed para montagem das sequências e o parâmetro phred20 de qualidade foi utilizado nas análises de bioinformática.

4.10 OBTENÇÃO DE SORO CONTENDO ANTICORPOS POLICLONAIS ESPECÍFICOS PARA SsaA

Os soros contendo anticorpos policlonais anti-SsaA foram obtidos utilizando proteínas recombinantes previamente produzidas em sistema de expressão heterólogo bacteriano (ROSA, 2016).

Neste sentido, a especificidade e sensibilidade dos anticorpos obtidos foi testada em ensaios conhecidos como *Western-blotting* ou *Imunoblotting* (BRITO, et al., 2011), utilizando extrato proteico secretado de *S. saprophyticus* ATCC 15305, conforme descrito a seguir.

4.11 ANÁLISES POR WESTERN-BLOTTING

Após eletroforese unidimensional, os géis contendo 40 µg de proteínas de proteínas extracelulares de cada estirpe, foram transferidos para membranas de nitrocelulose em tampão contendo 25 mM Tris-Base, 190 mM glicina, 20% (v/v) metanol, por 16 horas a 4 °C 20V. Após a visualização das bandas de proteínas pelo corante *Rouge-Ponceau* (*Sigma-Aldrich*), as membranas foram lavadas completamente com tampão contendo PBS 1X [Solução de Salina Tamponada com fosfato 1X (1.4 mM KH₂PO₄; 8mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; pH 7.3)] e Tween 20 0,01% (v/v) e então bloqueadas em tampão específico [Tampão de bloqueio (PBS 1X, 5% (w/v) leite desnatado, 0.01% (v/v) Tween 20)] por 2 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o soro contendo anticorpos policlonais contra SsaA de *S. saprophyticus*, por 2 horas. Os anticorpos foram diluídos em tampão de bloqueio na proporção de 1:1000 (v/v) para o anticorpo primário, e 1:5000 (v/v) para ao anticorpo secundário. Após o processo, as membranas foram novamente lavadas, incubadas com o anticorpo secundário anti-Mouse IgG conjugado a fosfatase alcalina (*Sigma-Aldrich*), por 1 hora, e reveladas com BCIP/NBT *Fast* [5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium (*Sigma-Aldrich*)], para visualização da ligação entre antígeno e anticorpo, após preparação da membrana em solução de fosfatase alcalina (NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, Tris Hcl 2M pH9,5 10% v/v).

5 RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DOS EXTRATOS DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES OBTIDOS

Ensaio de PCR com amostras de sobrenadante de cultura de *S. saprophyticus* foram realizados para determinar um tempo ideal de cultivo para a obtenção de proteínas secretadas sem a ocorrência de lise celular significativa. Assim, como descrito, proteínas secretadas de *S. saprophyticus* ATCC15305 foram obtidas, após incubação de 1, 3 e 6 horas em meio de cultura BHI. A sensibilidade da reação para a detecção da presença de DNA foi avaliada por meio da construção de uma curva de DNA genômico da cepa ATCC 15305, de concentração conhecida, englobando então as quantidades de 50 ng, 5 ng, 50 pg, 5 pg e 1 pg (figura 2A). Como mostrado, as reações foram realizadas utilizando amplicons de um fragmento de DNA de 189 pb, codificador do gene *rpsA* de *S. saprophyticus*. Na 1A, pode-se perceber que a quantidade mínima de material genético capaz de se amplificar na reação foi de 50 pg, sendo esta a linha mínima de detecção no sobrenadante livre de célula (linha 3).

A figura 2B apresenta os resultados das reações realizadas com sobrenadantes de cultura, nos tempos de 1 (linha 1), 3 (linha 2) e 6 horas (linha 3), mostrando que culturas realizadas nos tempos de 1 e 3 horas não apresentaram quantidades significativas de material genético capaz de ser amplificado, reforçando então a hipótese de que o sobrenadante de cultura, após incubação de 3 horas não apresenta lise celular significativa. Porém o tempo de 6 horas mostrou quantidades detectáveis de DNA, capaz de amplificar o gene *rpsA*, apontando a ocorrência de lise neste ponto. O aparecimento de uma banda inespecífica, visível na linha 2, pode ser devido à precipitação de elementos presentes no meio de cultura BHI, já que a reação foi realizada com amostra de sobredanante de cultura. Na figura 2C, um gel SDS/PAGE mostrou o perfil das proteínas secretadas após os três tempos de incubação.

Desta maneira, para a realização dos experimentos de proteômica, foi selecionado o tempo de incubação de 3 horas em meio rico (BHI), para a extração de um maior número de proteínas extracelulares de *S. saprophyticus*, sem lise celular.

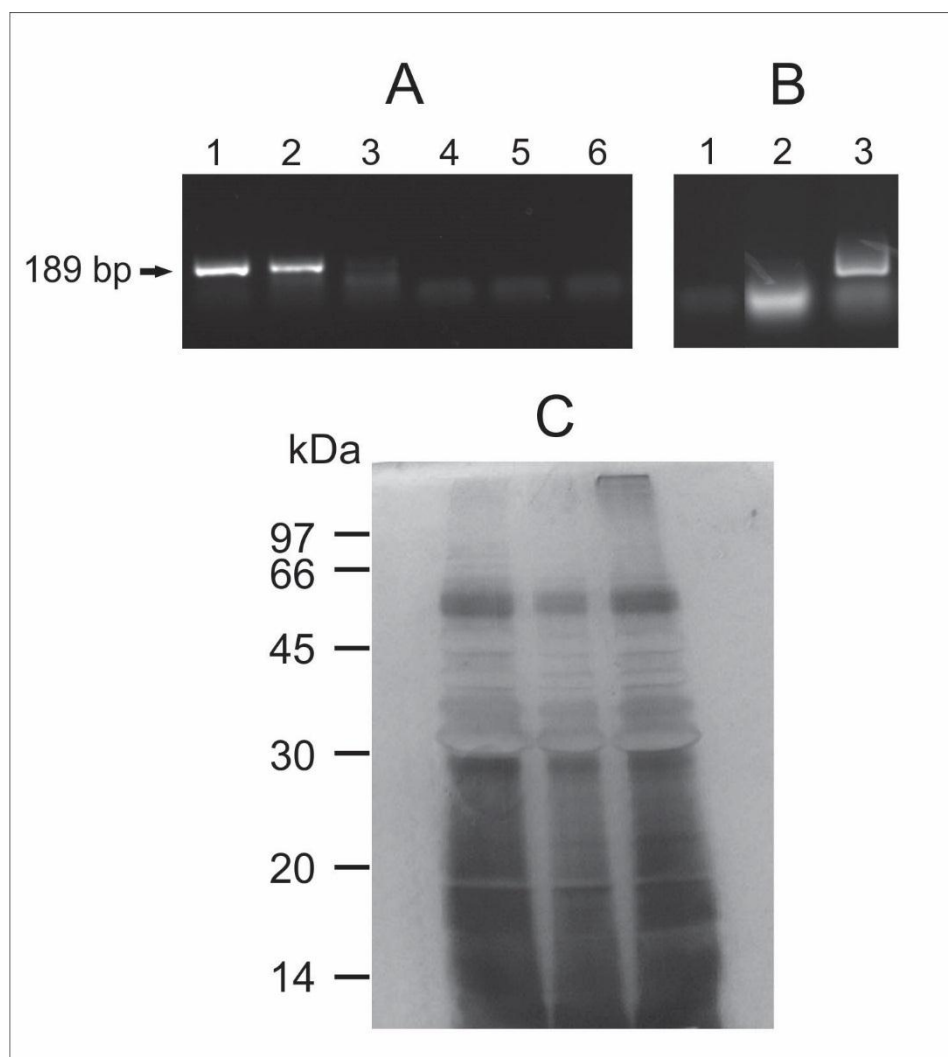


Figura 2. Análise de lise celular e perfil da secreção de proteínas de *S. saprophyticus* durante 3 períodos de incubação e. A: A sensibilidade da PCR para o gene *rpsA* foi avaliada utilizando DNA genômico de *S. saprophyticus* ATCC 15305 (cinco diluições) como um molde (50 ng e 1 pg). A PCR foi realizada com 5 concentrações de DNA genômico: 50 ng (1), 5 ng (2), 50 pg (3), 5 pg (4) e 1 pg (5). Um controle negativo sem DNA também foi utilizado no ensaio (6). B: PCR realizada com sobrenadante de cultura (2 mL) de *S. saprophyticus* concentradas em filtro de 3 kDa, obtida após 1 hora (1), 3 horas (2) e 6 horas (3) de incubação em meio BHI. C: Perfil do exoproteoma de *S. saprophyticus* após incubação de 1 hora, 3 horas e 6 horas (da esquerda para a direita). À esquerda é mostrado o marcador molecular de proteínas, de peso conhecido, em kDa.

5.2 PROTEÍNAS DETECTADAS NO EXOPROTEOMA DE *S. saprophyticus*

Este estudo incidiu sobre a comparação do exoproteoma das cepas clínicas ATCC 15305, 7108 e 9325 de *S. saprophyticus*, a fim de identificar diferenças na secreção de potenciais fatores de virulência deste uropatógeno humano. Deste modo, as proteínas identificadas por meio da nanoUPLC-MS^E, foram anotadas de acordo com o banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>), e categorizadas com base na sua função biológica, por meio das informações contidas no *Interpro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (tabelas de 1 a 7). Os registros iniciais originados pelas análises de bioinformática, mediante a comparação da expressão de proteínas entre duas cepas (análise de 2 em 2), se encontram nas tabelas suplementares 1, 2 e 3. As proteínas identificadas como comuns a 2 cepas foram caracterizadas em ordem decrescente do nível de expressão, por meio dos dados de expressão relativa, como mostrado nas tabelas 1, 2, 3 e 4. Os valores de p, apresentados nas tabelas 2, 3 e 4, são valores entre 0 e 1 que informam se a expressão da proteína é induzida ou reduzida, em relação às cepas analisadas, as quais foram incluídas nas análises moléculas com valores de p nos intervalos de $p \leq 0,05$, e $p \geq 0,95$. Nos dados apresentados nas tabelas 5, 6 e 7, são expostos os pontos PLGS, os quais se referem ao resultado de diferentes modelos matemáticos para a predição de peptídeos e de padrões de fragmentação do método utilizado.

A análise do proteoma extracelular de *S. saprophyticus*, indicou a secreção de 159 proteínas diferentes. Dentre elas, 44 foram expressas em comum pelas 3 cepas (ATCC 15305, 7108 e 9325), assim como 20 foram comuns apenas às cepas ATCC 15305 e 7108, 11 à ATCC 15305 e 9325, e 12 às cepas 7108 e 9325. O número de peptídeos identificados apenas em uma cepa foi de 15, 21 e 36, nas cepas 9325, ATCC 15305 e 7108, respectivamente (Figura 3 e Tabelas de 1 a 7).

Dentre as proteínas secretadas pelas 3 cepas analisadas, observam-se aquelas relacionadas ao metabolismo celular, como as enzimas envolvidas na via glicolítica enolase, triose-fosfato isomerase (TPI), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfoglicerato quinase (PGK) e frutose-bifosfato aldolase. Essas enzimas podem exercer funções diferentes fora da célula, sendo consideradas então como proteínas “*moonlighting*” (Tabela 1).

Proteínas pertencentes ao metabolismo de compostos de carbono, nucleotídeos e nucleosídeos, além daquelas referentes à via das pentoses e complexo da piruvato desidrogenase também foram detectadas nos 3 exoproteomas (Tabela 1). A L-lactato desidrogenase (LDH), envolvida no processo de fermentação láctica, também foi apontada, chamando atenção assim ao metabolismo anaeróbico de *S. saprophyticus*.

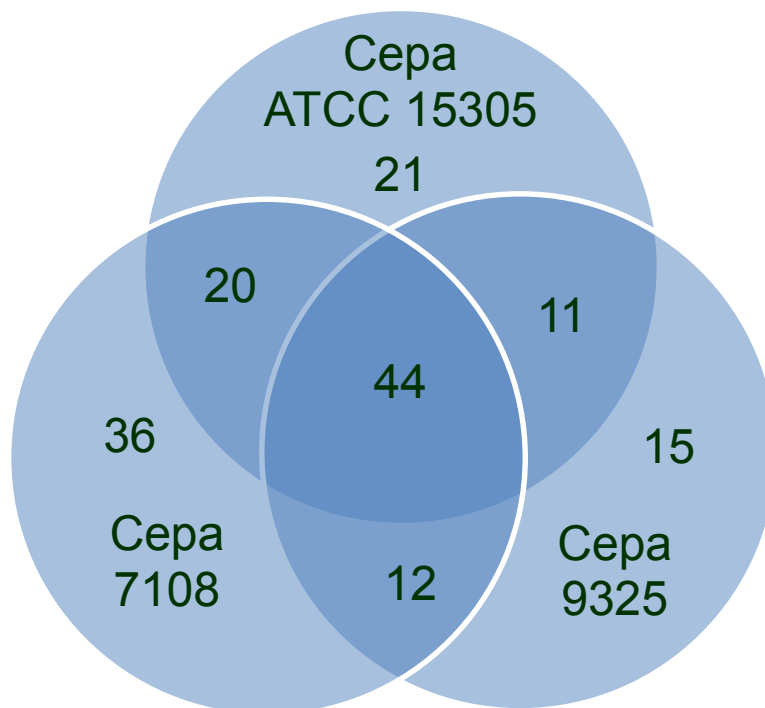


Figura 3. Diagrama de Venn da comparação dos exoproteomas das cepas ATCC 15305, 7108 e 9325 de *S. saprophyticus*, mostrando o número de proteínas identificadas em cada análise.

Foram encontradas também seis moléculas relacionadas diretamente à defesa contra o estresse oxidativo/nitrosativo, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC), a tiol peroxidase, a proteína de estresse universal, e uma proteína de ligação ao DNA induzível pela privação. Três transglicosilases foram identificadas, sendo elas a sceD 1, sceD 2 e sceD 3 (Tabela 1). Além de atuarem na síntese de parede celular, já foi descrito o papel das transglicosilases na resposta antigênica em modelo murino de infecção por *S. aureus* (LORENZ, et al., 2011).

Nota-se na Tabela 1, que as três cepas de *S. saprophyticus* também secretam uma proteína relacionada ao metabolismo de ferro, a ferritina, sendo este um mecanismo de sobrevivência utilizado por patógenos intracelulares (PORCHERON, et al., 2013).

Também foi detectada a secreção de duas enzimas com atividade proteolítica, relacionadas ao processamento de proteínas, mas que no meio extracelular podem estar intimamente envolvidas na virulência bacteriana (CARROLL, et al., 2012). São elas proteínas da família das proteases ou peptidases, denominadas de glutamil endopeptidase, oligopeptidase putativa. De modo geral, as três cepas secretam peptídeos com participações também na síntese de proteínas, sinalização e divisão celular, além de várias proteínas ribossomais e peptídeos ainda não caracterizados (Tabela 1).

Na Tabela 2 é possível observar que as cepas ATCC 15305 e 7108 secretam em comum um fator de virulência denominado de fator de uro-aderência A (UafA), o qual não foi encontrado no proteoma extracelular de *S. saprophyticus* 9325. Dentre as proteínas identificadas nas cepas ATCC 15305 e 9325, foram encontrados 2 antígenos secretados, sendo eles, o antígeno estafilocócico secretado A (SsaA), e 1 antígeno putativo, enquanto que a cepa 7108 não foi capaz de secretar proteínas classicamente antigênicas (Tabela 3). Em contraste, a cepa 7108 secretou 8 proteases (Tabelas 1, 4 e 6), sendo 4 delas proteínas exclusivas, denominadas de leucil aminopeptidase, metionina aminopeptidase, uma peptidase putativa e uma aminopeptidase putativa (Tabela 6), da mesma forma que a cepa ATCC 15305 secretou uma zinco metaloprotease exclusiva (Tabela 5).

A enzima ácido lipoteicóico sintase também foi apontada nos exoproteomas de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e 9325, como um fator responsável pela síntese de componente da parede celular de bactérias Gram-positivas, os ácidos lipoteicóicos (Tabela 3). Aparentemente, nenhuma proteína de interesse foi identificada exclusivamente na cepa 9325.

Tabela 1. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305, 7108 e 9325, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso	Descrição da proteína	Expressão relativa em relação ao ATCC 15305	
		7108	9325
Glicólise			
ENO_STAS1	Enolase	0,69	0,57
TPIS_STAS1	Triosefosfato isomerase	1,1	0,9
Q49VZ9_STAS1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	0,5	1,2
PGK_STAS1	Fosfoglicerato quinase	0,77	0,87
Q49Z72_STAS1	Frutose-bifosfato aldolase classe I	1,36	0,75
Completo de piruvato desidrogenase			
Q49WM1_STAS1	Diidrolipoil desidrogenase	3,7	0,62

Fermentação láctica

LDH_STAS1	L-lactato desidrogenase	0,3	0,71
-----------	-------------------------	-----	------

Via de pentoses fosfato

Q49YL0_STAS1	Transaldolase	2,18	0,82
--------------	---------------	------	------

Q49XD6_STAS1	Transcetolase	0,67	0,77
--------------	---------------	------	------

Q49XV6_STAS1	6-fosfogluconato desidrogenase	2,24	0,6
--------------	--------------------------------	------	-----

Metabolismo de compostos de carbono

2,3-bifosfoglicerato-dependente fosfoglicerato

GPMA_STAS1	mutase	4,01	0,85
------------	--------	------	------

Metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos

Q49Z85_STAS1	Purina nucleosídeo fosforilase DeoD	3,35	1,15
--------------	-------------------------------------	------	------

Sinalização celular

Q49ZE7_STAS1	Adenilato quinase	3	0,67
--------------	-------------------	---	------

Síntese de parede celular

SCED1_STAS1	Provável transglicosilase sceD 1	0,45	1,87
-------------	----------------------------------	------	------

SCED2_STAS1	Provável transglicosilase sceD 2	0,56	1,3
-------------	----------------------------------	------	-----

SCED3_STAS1	Provável transglicosilase sceD 3	0,45	1,87
-------------	----------------------------------	------	------

Q49WH3_STAS1	Autolisina bifuncional	0,37	0,71
--------------	------------------------	------	------

Síntese de proteínas

RS10_STAS1	Proteína ribossomal 30S S10	0,1	0,06
------------	-----------------------------	-----	------

RS16_STAS1	Proteína ribossomal 30S S16	1,61	1,33
------------	-----------------------------	------	------

RL25_STAS1	Proteína ribossomal 50S L25	1,69	0,62
------------	-----------------------------	------	------

RL29_STAS1	Proteína ribossomal 50S L29	2,88	1,06
------------	-----------------------------	------	------

RL7_STAS1	Proteína ribossomal 50S L7/L12	2,36	0,72
-----------	--------------------------------	------	------

EFTS_STAS1	Fator de alongamento Ts	2,2	0,44
------------	-------------------------	-----	------

EFTU_STAS1	Fator de alongamento Tu	0,46	0,65
------------	-------------------------	------	------

RRF_STAS1	Fator de reciclagem do ribossomo	2,88	0,81
-----------	----------------------------------	------	------

TIG_STAS1	Fator trigger	1,8	0,44
-----------	---------------	-----	------

Enovelamento, degradação e modificação de proteínas

Q4A0H6_STAS1	Glutamil endopeptidase	1,61	1,59
--------------	------------------------	------	------

Q49WC9_STAS1	Oligopeptidase putativa	2,66	0,93
--------------	-------------------------	------	------

CH10_STAS1	Chaperonina de 10 kDa	7	0,61
------------	-----------------------	---	------

CH60_STAS1	Chaperonina de 60 kDa	0,87	0,27
------------	-----------------------	------	------

Metabolismo de ferro

FTN_STAS1	Ferritina	3,45	0,77
-----------	-----------	------	------

Resposta ao estresse

AHPC_STAS1	Alquil hidroperóxido redutase subunidade C	6,17	2,29
------------	--	------	------

CATA_STAS1	Catalase	1,44	0,6
------------	----------	------	-----

TPX_STAS1	Provável tiol peroxidase	0,93	0,65
-----------	--------------------------	------	------

Q49Z86_STAS1	Proteína de ligação ao DNA induzível pela privação	1,84	0,39
--------------	--	------	------

SODM_STAS1	Superóxido dismutase [Mn/Fe]	5	0,77
------------	------------------------------	---	------

Q49YD5_STAS1	Proteína de estresse universal	8,41	0,32
--------------	--------------------------------	------	------

Proteínas não classificadas

Q4A0Y2_STAS1	Proteína hipotética	1,76	0,2
--------------	---------------------	------	-----

Q49VC9_STAS1	Proteína hipotética	0,54	1,36
--------------	---------------------	------	------

Q49ZZ3_STAS1	Proteína hipotética	0,86	1,09
--------------	---------------------	------	------

Q49VV4_STAS1	Proteína hipotética	2,05	0,74
Q49VF9_STAS1	Proteína hipotética	0,71	1,23
Y954_STAS1	Proteína hipotética	4,52	1,47
Y2125_STAS1	Proteína hipotética	2,43	0,57

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

Tabela 2. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305 e 7108, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso ¹	Descrição da proteína	Nível de expressão (Maior para o menor)	Expressão relativa 7108:15305	Valor de p ²
Metabolismo de compostos de carbono				
	2,3-bifosfoglicerato-independente			
GPMI_STAS1	fosfoglicerato mutase	7108 15305	31,82	1
Metabolismo de aminoácidos				
Q49XA2_STAS1	Glutamina sintetase	7108 15305	2,83	1
Síntese de ATP				
ATPB_STAS1	ATP sintase subunidade beta	7108 15305	2,27	1
Sinalização celular				
	Pirofosfatase inorgânica dependente de manganês			
PPAC_STAS1		7108 15305	1,35	0,98
Metabolismo de nucleotídeos e nucleotídeos				
NDK_STAS1	Nucleosídeo difosfato quinase	7108 15305	1,88	1
Transcrição				
Q49WH6_STAS1	Regulador transcricional	15305 7108	0,36	0
Q49V17_STAS1	Proteína ligante de RNA putativo	7108 15305	2,59	1
	Subunidade alfa de RNA polimerase dependente de DNA			
RPOA_STAS1		7108 15305	1,52	1
Síntese de proteínas				
RL21_STAS1	Proteína ribossomal 50S L21	15305 7108	0,61	0
RL32_STAS1	Proteína ribossomal 50S L32	7108 15305	2,56	1
RL35_STAS1	Proteína ribossomal 50S L35	7108 15305	2,39	1
Enovelamento, degradação e modificação de proteínas				
GRPE_STAS1	Proteína grpE	7108 15305	1,43	1
DNAK_STAS1	Proteína chaperona DnaK	15305 7108	0,90	0
Metabolismo de nitrogênio				
URE3_STAS1	Urease subunidade gama	7108 15305	2,36	1
Síntese de parede celular				
	D-alanina-poli(fosforibitol) ligase subunidade 2			
DLTC_STAS1		7108 15305	3,60	1
Resposta ao estresse				
Q49YH5_STAS1	Tiorredoxina	7108 15305	1,93	1
Fatores de virulência				
UAFA_STAS1	Fator de uro-aderência A	7108 15305	3,56	1
Proteínas não classificadas				

Q49W44_STAS1	Proteína hipotética	7108 15305	3,22	1
Q49ZI5_STAS1	Proteína hipotética	7108 15305	2,92	1
Y1625_STAS1	Proteína hipotética	7108 15305	2,61	1

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

² Os valores de p correspondem a valores entre 0 e 1, os quais valores de 0-0,05 foram considerados com expressão reduzida e 0,95-1 com expressão induzida, em relação às cepas analisadas.

Tabela 3. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305 e 9325, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso ¹	Descrição da proteína	Nível de expressão (Maior para o menor)	Expressão relativa 9325:15305	Valor de p ²
Complexo de piruvato desidrogenase				
Q49WL9_STAS1	Piruvato desidrogenase E1	15305 9325	0,85	0
Síntese de proteínas				
RS7_STAS1	Proteína ribossomal 30S S7	9325 15305	1,70	1
RL23_STAS1	Proteína ribossomal 50S L23	15305 9325	0,53	0
RL5_STAS1	Proteína ribossomal 50S L5	9325 15305	1,43	1
Síntese de parede celular				
LTAS_STAS1	Ácido lipoteicóico sintase	15305 9325	0,47	0
Metabolismo de cofatores e vitaminas				
PDXS_STAS1	Piridoxal biossíntese liase PdxS	9325 15305	1,40	1
Resposta ao estresse				
Y1056_STAS1	Proteína putativa de estresse universal	15305 9325	0,52	0
Fatores de virulência				
Q49VK7_STAS1	Proteína similar ao Antígeno secretado SsaA	9325 15305	1,32	1
Q49ZL8_STAS1	Antígeno putativo secretado	9325 15305	3,25	1
Proteínas não classificadas				
Y1806_STAS1	Proteína hipotética	9325 15305	1,22	1
Q49VP3_STAS1	Proteína hipotética	15305 9325	0,80	0

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

² Os valores de p correspondem a valores entre 0 e 1, os quais valores de 0-0,05 foram considerados com expressão reduzida e 0,95-1 com expressão induzida, em relação às cepas analisadas.

Tabela 4. Lista de proteínas detectadas nos exoproteomas de *S. saprophyticus*, cepas 9325 e 7108, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso ¹	Descrição da proteína	Nível de expressão (Maior para o menor)	Expressão relativa 9325:7108	Valor de p ²
-------------------------------	-----------------------	---	------------------------------	-------------------------

Metabolismo de compostos de carbono				
Q49ZH5_STAS1	Glicose-1-desidrogenase	9325 7108	1,84	1
Metabolismo de aminoácidos				
GCSH_STAS1	Proteína H do sistema de clivagem da glicina	7108 9325	0,57	0
Síntese de ácidos graxos				
Q49WB7_STAS1	3-oxoacil-[proteína carreadora de acil] sintase	7108 9325	0,73	0
Transporte				
Q4A0L3_STAS1	Aminoácido do sistema de transporte da permease tipo ABC	7108 9325	0,48	0
Síntese de proteínas				
RS6_STAS1	Proteína ribossomal 30S S6	7108 9325	0,57	0
RL2_STAS1	Proteína ribossomal 50S L2	7108 9325	0,86	0,04
RL30_STAS1	Proteína ribossomal 50S L30	7108 9325	0,23	0
GATC_STAS1	Aspartil/glutamil-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase	7108 9325	0,18	0
Enovelamento, degradação e modificação de proteínas				
Y1059_STAS1	Peptidase não classificada	7108 9325	0,66	0
Proteínas não caracterizadas				
Y1146_STAS1	Proteína hipotética	7108 9325	0,62	0
Q49YQ1_STAS1	Proteína hipotética	7108 9325	0,57	0
Q49XP1_STAS1	Proteína hipotética	7108 9325	0,35	0

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

² Os valores de p correspondem a valores entre 0 e 1, os quais valores de 0-0,05 foram considerados com expressão reduzida e 0,95-1 com expressão induzida, em relação às cepas analisadas.

Tabela 5. Lista de proteínas detectadas exclusivamente no exoproteoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso ¹	Descrição da proteína	Pontos PLGS ²
Metabolismo de aminoácidos		
DHA_STAS1	Alanina desidrogenase	3729,86
Q49W97_STAS1	Glutamato desidrogenase	1686,45
Transcrição		
CODY_STAS1	Repressor pleiotrópico transcricional sensível à GTP	970,86
Síntese de parede celular		
Q49XP8_STAS1	Amidase extracelular putativa	1962,78
Q49UH9_STAS1	Domínio similar ao Mannosil-glicoproteína endo-beta-N-acetilglucosamidase	4933,57
Síntese de proteínas		
RS1_STAS1	Proteína ribossomal 30S S1	1192,02
RS9_STAS1	Proteína ribossomal 30S S9	4012,77
Enovelamento, degradação e modificação de proteínas		
Q49X11_STAS1	Zinco metaloprotease	1487,34

Transporte		
Q49XG0_STAS1	Transportador ABC de ribose	1652,9
Q49XC5_STAS1	Putativa Proteína ligante de fosfato fosfonato ABC	1019,83
Q49XN3_STAS1	Componente do sistema PTS glicose específico IIA	1776,3
Metabolismo de nitrogênio		
UREG_STAS1	Proteína acessória urease UreG	1999,7
Resposta ao estresse		
QOX2_STAS1	Provável quinol oxidase subunidade 2	1108,42
Q49WV6_STAS1	Proteína antibacteriana putativa	5105,04
Proteínas não classificadas		
Y1897_STAS1	Proteína hipotética	1266
Q49UH8_STAS1	Proteína hipotética	1790,9
Q49X01_STAS1	Proteína hipotética	1065,71
Q49XC4_STAS1	Proteína hipotética	3531,9
Q49ZW4_STAS1	Proteína hipotética	4125,14
Q4A056_STAS1	Proteína hipotética	1319,87
Y1964_STAS1	Proteína hipotética	2414,64

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

² Pontos PLGS refere-se ao resultado de diferentes modelos matemáticos para peptídeos e predição de padrões de fragmentação.

Tabela 6. Lista de proteínas detectadas exclusivamente no exoproteoma de *S. saprophyticus* 7108, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso ¹	Descrição da proteína	Pontos PLGS ²
Metabolismo de compostos de carbono		
HPS1_STAS1	3-hexulose-6-fosfato sintase 1	6613,03
Q49VE1_STAS1	Fosfotransacetilase	3529,3
Y1389_STAS1	Provável tautomerase	2268,51
Complexo de piruvato desidrogenase		
Q49WM0_STAS1	Componente Diidrolipoamido S-acetiltransferase do complexo E2 de piruvato desidrogenase	1130,77
Via das pentoses fosfato		
Q49XV2_STAS1	Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase	5142,35
Q49X03_STAS1	Ribulose-fosfato 3-epimerase	2251,76
Reparo de DNA		
END4_STAS1	Provável endonuclease 4	3651,2
Divisão celular		
Q49XQ2_STAS1	Proteína putativa de iniciação da divisão celular	1675,95
Q49Y87_STAS1	Proteína putativa de determinação da forma celular	1165,57
Transcrição		
GRE_A_STAS1	Fator de alongamento transcricional GreA	3929,46

RPOE_STAS1	Provável subunidade de RNA polimerase dependente de DNA	6199,2
Q49UQ1_STAS1	Proteína ligante de DNA fita simples	1894,92
Síntese de proteínas		
RS19_STAS1	Proteína ribossomal 30S S19	10397,65
RL17_STAS1	Proteína ribossomal 50S L17	1225,88
RL20_STAS1	Proteína ribossomal 50S L20	1715,27
RL22_STAS1	Proteína ribossomal 50S L22	3783,98
RL24_STAS1	Proteína ribossomal 50S L24	2271,61
RL27_STAS1	Proteína ribossomal 50S L27	3553,65
RL31B_STAS1	Proteína ribossomal 50S L31 tipo B	5368,22
RL36_STAS1	Proteína ribossomal 50S L36	5947,49
RL9_STAS1	Proteína ribossomal 50S L9	5348,97
Q49WL6_STAS1	Peptídeo deformilase 2	3633,64
Enovelamento, degradação e modificação de proteínas		
Q49YS4_STAS1	Leucil aminopeptidase	2553,56
Q49YT3_STAS1	Metionina aminopeptidase	1207,83
Q49XX4_STAS1	Peptidase putativa	2608,88
Q49YH6_STAS1	Aminopeptidase putativa	1664,74
PPI1_STAS1	Putativa peptidil-prolil cis-trans isomerase	2311,29
Q49ZX5_STAS1	Proteína putativa pequena de choque térmico	1918,15
Transporte		
Q49W50_STAS1	Lipoproteína da família NlpA	2727,01
Q49WK6_STAS1	Proteína fosfocarreadora HPr	1220,97
Metabolismo de nitrogênio		
URE1_STAS1	Subunidade alfa da urease	2320,21
Resposta ao estresse		
Q49W43_STAS1	Tiorredoxina putativa	16221,01
Proteína hipotéticas		
Q49V15_STAS1	Proteína hipotética	7688,73
Q49UZ2_STAS1	Proteína hipotética	3939,43
Y1897_STAS1	Proteína hipotética	3236,93
Y0419_STAS1	Oxidoredutase não classificada	2382,17

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

² Pontos PLGS refere-se ao resultado de diferentes modelos matemáticos para peptídeos e predição de padrões de fragmentação.

Tabela 7. Lista de proteínas detectadas exclusivamente no exoproteoma de *S. saprophyticus* 9325, classificadas de acordo com sua função biológica.

Número de acesso ¹	Descrição da proteína	Pontos PLGS ²
Síntese de ATP		
Y1834_STAS1	Proteína similar à NADH desidrogenase	3427,51
Metabolismo de aminoácidos		

GLYA_STAS1	Serina hidroximetiltransferase	1899,67
Replicação de DNA		
Q49Z44_STAS1	Proteína ligante de DNA fita simples	992,36
Transcrição		
Q49ZN1_STAS1	Regulador transcricional putativo	1945,84
Divisão celular		
SP5G_STAS1	Proteína putativa de septação spoVG	1899,64
Síntese de proteínas		
RS12_STAS1	Proteína ribossomal 30S S12	2981,56
RS18_STAS1	Proteína ribossomal 30S S18	2693,94
RS5_STAS1	Proteína ribossomal 30S S5	2236,92
RL19_STAS1	Proteína ribossomal 50S L19	2770,94
Resposta ao estresse		
ASP23_STAS1	Proteína de choque alcalino 23	2128,81
OHRL1_STAS1	Proteína de resistência ao hidroperóxido orgânico	1312,66
Proteínas não classificadas		
Y1134_STAS1	Proteína hipotética	1359,68
Q4A067_STAS1	Proteína hipotética	3175,2
Q49XB9_STAS1	Proteína hipotética	1058,97
Q4A0F5_STAS1	Proteína hipotética	1333,85

¹ Número de acesso obtido em banco de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>).

² Pontos PLGS refere-se ao resultado de diferentes modelos matemáticos para peptídeos e predição de padrões de fragmentação.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO ESTAFILOCÓCICO SECRETADO A (SsaA) POR WESTERN-BLOTTING

Como mostrado na tabela 3, o antígeno estafilocócico secretado A (SsaA), um peptídeo altamente imunogênico e abundante no exoproteoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 (OLIVEIRA, 2014), não foi detectado no extrato proteico secretado de *S. saprophyticus* 7108, em nenhuma das replicatas proteômicas. Para avaliar o dado, foram realizados ensaios de Western-blotting. Desta forma, um gel SDS-PAGE contendo 40 µg de proteínas secretadas pelas cepas ATCC 15305, 7108 e 9325 (figura 4A) foi transferido para membrana de nitrocelulose, e incubado então com soro contendo anticorpos policlonais recombinantes anti-SsaA (figura 4B), previamente produzido pelo nosso grupo (ROSA, 2016). Na figura 4B é possível observar que os anticorpos foram capazes de reagir a amostras provindas das cepas ATCC 15305 (1) e 9325 (3), mas não à da cepa 7108 (2). A figura 4B também mostrou que a ligação de anticorpos anti-SsaA em *S. saprophyticus* 9325 foi maior do que na cepa ATCC 15305, comprovando que a cepa 9325 secreta

quantidades maiores de SsaA, em relação à ATCC 15305, como mostrado nos dados proteômicos (Tabela 3).

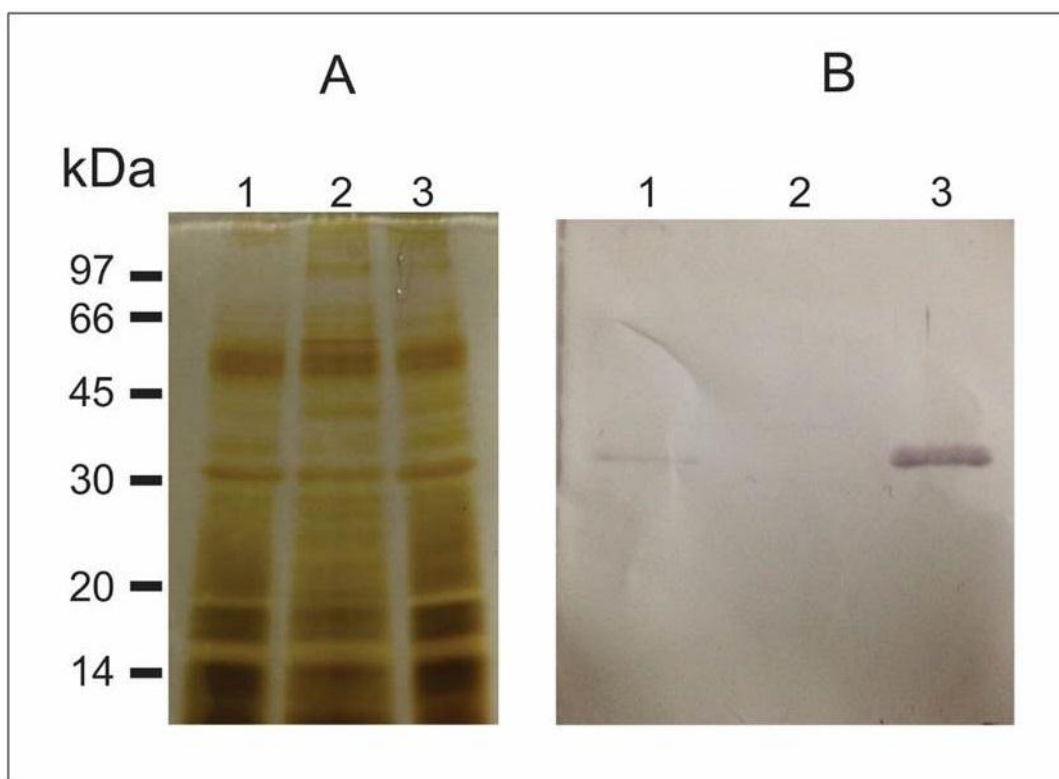


Figura 4. Validação dos dados proteômicos com anticorpos policlonais anti-SsaA. A: Gel SDS-PAGE contendo os extratos de exoproteoma das 3 cepas analisadas: 1. ATCC 15305; 2. 7108; 3. 9325. B: Western-blotting realizado com soro contendo anticorpos policlonais anti-SsaA com as amostras de exoproteoma mostradas em A. Um marcador padrão de peso molecular conhecido (kDa) está indicado à esquerda do gel.

5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO DO GENE *ssaA*

Diante do resultado obtido por Western-blotting, uma reação de PCR foi realizada, para avaliar a presença do gene codificante da proteína SsaA em *S. saprophyticus* 7108. Fragmentos de DNA codificantes do gene *ssaA* foram amplificados por meio de oligonucleotídeos específicos, DNA genômico das 3 cepas em estudo e adicionado à reação, um controle negativo sem DNA (figura 5, linha 1). Desta maneira, um gel de agarose a 1% foi confeccionado, a fim de visualizar os produtos da reação. Na figura 5,

observa-se a amplificação de *SsaA* nas cepas ATCC 15305 (2), 7108 (3) e 9325 (4), apontando então a presença do gene nas 3 cepas, embora 7108 não apresente níveis detectáveis da proteína em sobrenadante livre de célula.

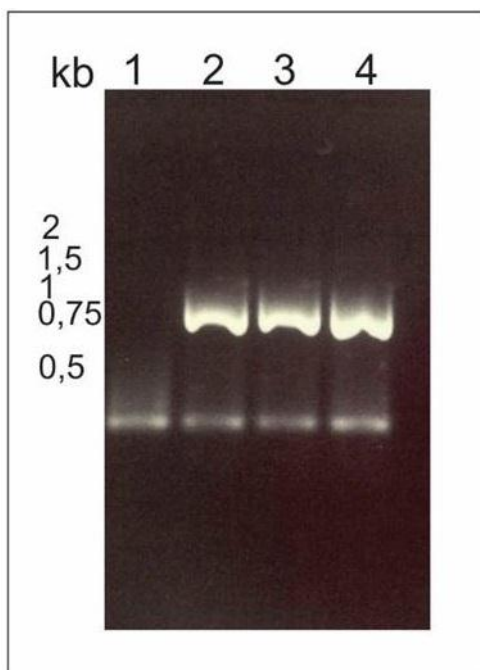


Figura 5. Análise da presença do gene codificante para SsaA em 3 cepas de *S. saprophyticus*. PCR realizada com primers específicos para o gene codificante de SsaA. 1. Controle negativo; 2. PCR com DNA genômico da cepa ATCC 15305 de *S. saprophyticus*; 3. PCR com DNA genômico da cepa 7108 de *S. saprophyticus*; 4. PCR com DNA genômico da cepa 9325 de *S. saprophyticus*. Um marcador de DNA de tamanho conhecido, em kb, é mostrado à esquerda da imagem.

Nesse sentido, para analisar a estrutura gênica de *ssaA* nas 3 cepas de *S. saprophyticus*, uma reação de sequenciamento foi realizada, utilizando os primers sentido e antissentido, a partir dos produtos da PCR já realizada. O sequenciamento foi feito em quadruplicata experimental, através do método de Sanger. Por meio dos dados obtidos, um alinhamento gênico das 3 cepas foi montado, a fim de avaliar a similaridade dos nucleotídeos. Desta maneira, foi possível sequenciar completamente a região codante do gene *ssaA* das três cepas, mostrando que o gene *ssaA* não apresenta variação de nucleotídeos nas estirpes analisadas, apresentando-se completamente idênticos (Figura 6). Os códon de início e de parada da região codante do gene *ssaA* estão evidenciados na figura 6, nas cores amarela e vermelha, respectivamente.

ATCC15305 ATGAAAAAAAAATCGCTACAGCTACTATCGCTACTGCAGGAATCGCTACTTTTGCTTTTGCA
 Cepa9325 ATGAAAAAAAAATCGCTACAGCTACTATCGCTACTGCAGGAATCGCTACTTTTGCTTTTGCA
 Cepa7108 ATGAAAAAAAAATCGCTACAGCTACTATCGCTACTGCAGGAATCGCTACTTTTGCTTTTGCA

ATCC15305 CAACATGATGCAGATGCAGCAGAAAAACAACAATAGTGGGTACAACCCAAATGACCCAAGT
 Cepa9325 CAACATGATGCAGATGCAGCAGAAAAACAACAATAGTGGGTACAACCCAAATGACCCAAGT
 Cepa7108 CAACATGATGCAGATGCAGCAGAAAAACAACAATAGTGGGTACAACCCAAATGACCCAAGT

ATCC15305 TCATATAGCTATTTCATATACTATAGATCAACAAGGTCAATACCACTACACTTGGCAAGGT
 Cepa9325 TCATATAGCTATTTCATATACTATAGATCAACAAGGTCAATACCACTACACTTGGCAAGGT
 Cepa7108 TCATATAGCTATTTCATATACTATAGATCAACAAGGTCAATACCACTACACTTGGCAAGGT

ATCC15305 AACTGGAACCCAAGCAACAGTGACCAAGGTCACACTAGCAACGGTTACAGCAATGCTAAC
 Cepa9325 AACTGGAACCCAAGCAACAGTGACCAAGGTCACACTAGCAACGGTTACAGCAATGCTAAC
 Cepa7108 AACTGGAACCCAAGCAACAGTGACCAAGGTCACACTAGCAACGGTTACAGCAATGCTAAC

ATCC15305 TCAACTAACATAATGCAACTCAATCATATACAAC TAATAACCAAGGTACTGGTGGTAAA
 Cepa9325 TCAACTAACATAATGCAACTCAATCATATACAAC TAATAACCAAGGTACTGGTGGTAAA
 Cepa7108 TCAACTAACATAATGCAACTCAATCATATACAAC TAATAACCAAGGTACTGGTGGTAAA

ATCC15305 GGTGCAGTTTCTCACTCTACTTCAAACAGCAATGTTAAAGTAAGTACAAC TAGCGCGCCA
 Cepa9325 GGTGCAGTTTCTCACTCTACTTCAAACAGCAATGTTAAAGTAAGTACAAC TAGCGCGCCA
 Cepa7108 GGTGCAGTTTCTCACTCTACTTCAAACAGCAATGTTAAAGTAAGTACAAC TAGCGCGCCA

ATCC15305 TCAAATTCAAATGGTTCAAACCTCAATTTCTAATACTTCAGGTTCTTCAAACAAC TTATAC
 Cepa9325 TCAAATTCAAATGGTTCAAACCTCAATTTCTAATACTTCAGGTTCTTCAAACAAC TTATAC
 Cepa7108 TCAAATTCAAATGGTTCAAACCTCAATTTCTAATACTTCAGGTTCTTCAAACAAC TTATAC

ATCC15305 ACAGCTGGACAATGTACATATTATGTATATGACAAAGTTGGTGGTAAAATGGTTCAACT
 Cepa9325 ACAGCTGGACAATGTACATATTATGTATATGACAAAGTTGGTGGTAAAATGGTTCAACT
 Cepa7108 ACAGCTGGACAATGTACATATTATGTATATGACAAAGTTGGTGGTAAAATGGTTCAACT

ATCC15305 TGGGGTAACGCTAACAACTGGGCAAGCGCAGCTGCTGCTTCAGGTTACACAGTAAACAAC
 Cepa9325 TGGGGTAACGCTAACAACTGGGCAAGCGCAGCTGCTGCTTCAGGTTACACAGTAAACAAC
 Cepa7108 TGGGGTAACGCTAACAACTGGGCAAGCGCAGCTGCTGCTTCAGGTTACACAGTAAACAAC

ATCC15305 TCACCTGCTTCAGGTTTCAGTCTTACAATCAACTGCTGGTGGATATGGCCACGTAGCATACT
 Cepa9325 TCACCTGCTTCAGGTTTCAGTCTTACAATCAACTGCTGGTGGATATGGCCACGTAGCATACT
 Cepa7108 TCACCTGCTTCAGGTTTCAGTCTTACAATCAACTGCTGGTGGATATGGCCACGTAGCATACT

ATCC15305 GTTGAAAATGTAAACAGTGACGGTTCAATCAACGTTTCTGAAATGAACTATGGTCAAGGT
 Cepa9325 GTTGAAAATGTAAACAGTGACGGTTCAATCAACGTTTCTGAAATGAACTATGGTCAAGGT
 Cepa7108 GTTGAAAATGTAAACAGTGACGGTTCAATCAACGTTTCTGAAATGAACTATGGTCAAGGT

ATCC15305 GCTGGAGTTGTTACTTTCACGTACAATCTCTGCAAGCGAAGCTTCAGGTTACAAC TACATT
 Cepa9325 GCTGGAGTTGTTACTTTCACGTACAATCTCTGCAAGCGAAGCTTCAGGTTACAAC TACATT
 Cepa7108 GCTGGAGTTGTTACTTTCACGTACAATCTCTGCAAGCGAAGCTTCAGGTTACAAC TACATT

ATCC15305 CACTAA
 Cepa9325 CACTAA
 Cepa7108 CACTAA

Figura 6. Alinhamento do gene *ssaA* das cepas ATCC 15305, 9325 e 7108 de *S. saprophyticus*. O gene *SsaA* das 3 estirpes, após amplificação por PCR utilizando primers específicos, foram utilizados para sequenciamento com ambos os primers (sentido e antissentido) em quadriplicata experimental. Por meio do sequenciamento pelo método de Sanger, foi possível sequenciar por completo a região codante do gene *ssaA* das três cepas. Em amarelo está destacado o ATG inicial da região codante e em vermelho está destacado o códon de parada do gene (TAA).

6 DISCUSSÃO

6.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM COMUM NO EXOPROTEOMA DE *S. saprophyticus*, cepas ATCC 15305, 7108 e 9325

S. saprophyticus é um SCN que coloniza o trato gastrointestinal e geniturinário de seres humanos, e pode se comportar como um patógeno causador de infecções urinárias, principalmente cistite em mulheres jovens (ORDEN-MARTÍNEZ, et al., 2007; TRIVEDI, et al., 2015). Do ponto de vista do processo infeccioso, o conhecimento da composição do proteoma extracelular bacteriano é de extrema importância, já que este compartimento contém proteínas que interagem diretamente com o hospedeiro, sofrendo variação sob muitos fatores de estresse ambiental (ECONOMOU, et al., 2002; ABBY, et al., 2016). Nesse sentido, o presente estudo incidiu sobre a identificação e comparação de proteínas secretadas para o meio extracelular, a partir das 3 estirpes *S. saprophyticus*, na tentativa de detectar potenciais fatores atuantes na patogênese de infecções causadas por este microrganismo.

Com este objetivo, por meio da nanoUPLC-MS^E, foram detectadas proteínas de *S. saprophyticus* que podem claramente ampliar a compreensão do potencial infeccioso desta espécie uropatogênica. Como mostrado, das 159 proteínas identificadas no estudo, apenas 44 foram comuns às cepas ATCC 15305, 7108 e 9325 de *S. saprophyticus*. Os dados obtidos revelam a flexibilidade de bactérias patogênicas em expressar proteínas diferentes em momentos diferentes, o qual é similar ao encontrado no exoproteoma de outras espécies do gênero, como *S. aureus* (ZIEBANDT, et al., 2010; SILJAMAKI, et al., 2014A; BONAR, et al, 2016).

Como exemplo, temos o estudo realizado por Ziebandt e colaboradores, em 2010, que revelou perfis exoproteômicos altamente heterogêneos, após a análise de 25 cepas clínicas de *S. aureus*. Das proteínas 63 preditas para o meio extracelular, apenas 11 foram identificadas em todas as cepas. Além disso, a análise comparativa do exoproteoma de cepas de *S. aureus* envolvidos em infecções de pele e tecidos moles, bacteremia e colonização subclínica, demonstrou um perfil de proteínas extracelulares completamente diferentes, sugerindo que a plasticidade do exoproteoma é devido a fatores externos, como a disponibilidade de nutrientes e local da infecção (LIEW, et al., 2015).

6.1.1 Proteínas secretadas relacionadas ao metabolismo de carboidratos

O metabolismo de carboidratos é extremamente conservado em todos os seres vivos, e qual inclui processos bioquímicos conhecidos como glicólise, glicogênese, fermentação, ciclo do ácido cítrico (TCA) e cadeia transportadora de elétrons (LIEBERMAN & MARKS, 2009).

No exoproteoma de *S. saprophyticus*, foram encontradas inúmeras proteínas de localização citoplasmáticas, que estão envolvidas diretamente a processos metabólicos centrais. Dentre elas, destacam-se as proteínas envolvidas em vias de obtenção de energia, como glicólise e fermentação láctica. As enzimas atuantes na via glicólica, muitas vezes desempenham papéis diferentes, quando localizadas fora da célula, caracterizando-se então como moléculas “*moonlighting*”. As proteínas *moonlighting*, portanto, são aquelas que apresentam funções bem caracterizadas dentro da célula, mas que em outros compartimentos como superfície e meio extracelular, podem apresentar novas funções, muitas das quais relacionadas à virulência bacteriana (HENDERSON & MARTIN, 2011; AMBLEE & JEFFERY, 2015).

Todas as cepas de *S. saprophyticus* foram capazes de secretar proteínas com função *moonlighting*, moléculas comumente encontradas em frações extracelulares de bactérias patogênicas. Algumas delas apresentam papéis extracelulares bem estabelecidos, como as enzimas participantes da glicólise e gliconeogênese, enolase, triose-fosfato isomerase (TPI), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a frutose-bifosfato aldolase (CARNEIRO, et al., 2004; HENDERSON & MARTIN, 2011; SILJAMAKI, et al., 2014A).

Uma das primeiras proteínas a ter seu papel *moonlighting* apontado, foi a GAPDH, descrita primeiramente em espécies do gênero *Streptococcus*. Além de participar das reações de oxidação e fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato durante a glicólise, a GAPDH quando presente na superfície celular de *Streptococcus pyogenes*, age como um receptor da plasminogênio, promovendo aderência a moléculas da matriz extracelular (HENDERSON & MARTIN, 2011).

Uma vez ativado pela GAPDH ou outra proteína *moonlighting* de superfície, o plasminogênio leva a formação da plasmina, uma serina-protease capaz de degradar células da matriz extracelular do hospedeiro, e permitir a migração do microrganismo através dos tecidos (AMBLEE & JEFFERY, 2015). A ligação ao plasminogênio é um mecanismo utilizado por muitos patógenos, para invadir tecidos do hospedeiro, sendo que aderência é um processo inicial na interação patógeno-hospedeiro. Desta forma, além de ligante de

plasminogênio, *S. aureus* e *S. epidermidis* utilizam a GAPDH extracelular, como uma proteína de ligação à transferrina, para a aquisição de ferro a partir do hospedeiro (AMBLEE & JEFFERY, 2015). Em *S. aureus*, a GAPDH, quando na superfície celular, também pode estar envolvida na formação de biofilmes (ISLAM, et al., 2014).

A enolase, uma das proteínas citoplasmáticas mais abundantes em *S. aureus*, foi notada também em frações de superfície celular (surfacoма) e extracelular (exoproteoma) (DREISBACH et al. 2011; MUTHUKRISHNAN et al. 2011). Sua característica de se apresentar como proteína *moonlighting* foi observada em *S. aureus*, como uma adesina, capaz de ser ligar tanto à laminina, como ao plasminogênio presente na matriz extracelular do hospedeiro, podendo exercer então, uma função importante na patogênese de *S. aureus* (CARNEIRO, et al., 2004; HENDERSON & MARTIN, 2011; AMBLEE & JEFFERY, 2015).

Além da função adesiva descrita na enolase, a sua presença no meio extracelular pode ser mais uma estratégia de virulência utilizada por *S. aureus*, uma vez que esta proteína, por ser universalmente conservada, conseguirá burlar o sistema imunitário do hospedeiro com mais facilidade (DREISBACH et al., 2010).

O nosso grupo, em 2014, por meio de dois trabalhos, detectou a presença da enolase no surfacoма e no exoproteoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 (CARVALHO, 2014; OLIVEIRA, 2014). Oliveira demonstrou também que a enolase extracelular de *S. saprophyticus* é capaz de incitar a uma resposta imune humoral em camundongos Balb/c, caracterizando então sua atividade imunogênica. Estudos posteriores com mutantes para a proteína enolase de *S. saprophyticus* poderão elucidar a função desta proteína neste modelo.

Yamaguchi e colaboradores (2010) mostraram que a TPI presente na superfície de *S. aureus*, apresentou atividade de adesina, atuando como mediadora da morte celular por contato do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*. A TPI foi descrita no também fungo patogênico *P. brasiliensis*, como uma adesina ancorada à parede celular, ligante de fibronectina e laminina do hospedeiro, contribuindo assim para a sua capacidade de invasão ao hospedeiro (PEREIRA et al., 2007).

No eucarioto *Candida albicans*, a frutose-bifosfato aldolase se apresenta como uma ligante de plasminogênio, enquanto que em *Neisseria meningitidis* ela atua como uma adesina, durante interação com células do hospedeiro (AMBLEE & JEFFERY, 2015). Em *Streptococcus pneumoniae*, a frutose-bifosfato aldolase age como uma lectina de superfície celular que se liga ao receptor caderina, e juntamente com a GAPDH, podem apresentar

efeitos imunogênicos, quando presentes na superfície celular (BLAU et al., 2007; LING, et al., 2004).

Desta forma, é possível que as enzimas atuantes na via glicolítica, enolase, TPI, GAPDH, e frutose bifosfato-aldolase, atuem durante processo infeccioso, facilitando a aderência de *S. saprophyticus* ao epitélio urogenital, porém estudos posteriores são necessários para estabelecer as reais funções extracelulares dessas proteínas, em *S. saprophyticus*.

A L-lactato desidrogenase (LDH), é uma enzima catalítica envolvida no processo de fermentação láctica, via de obtenção de energia comum à *S. saprophyticus*, quando em condições anaeróbicas. Apesar de produzir um baixo índice de energia, o metabolismo fermentativo de algumas bactérias patogênicas é crucial, visto que se trata um mecanismo essencial na sua adaptação frente às mudanças na disponibilidade de oxigênio (GREEN, et al., 2014; ZÜHLKE, et al., 2016).

A aquisição de inúmeros determinantes de virulência proporciona à *S. aureus* um grau de patogenicidade maior do que a encontrada em outras espécies do gênero, de modo que a privação de oxigênio leva à reorganização do proteoma de *S. aureus*. A adaptação metabólica de *S. aureus*, frente a condições variadas encontradas durante o processo infeccioso, como hipóxia e estresse nitrosativo, contribui significadamente para a sua virulência (VITKO, et al., 2016; ZÜHLKE, et al., 2016).

A LDH específica de *S. aureus* catalisa a reação de redução de piruvato a L-lactato, com a oxidação concomitante de NADH a NAD⁺. Este mecanismo, em bactérias anaeróbicas, além de promover a obtenção de energia em ambientes com depleção de oxigênio, ajuda a manter o equilíbrio redox celular em células que são incapazes de respirar devido a danos mediados pelo estresse nitrosativo derivado do óxido nítrico (NO) (FLANNAGAN, et al., 2015).

Deste modo, a LDH de *S. aureus* apresenta ser induzida em resposta ao NO⁻, uma vez que este ânion perturba o metabolismo redox de *S. aureus*, afetando sua homeostase. Para contornar este efeito, portanto, *S. aureus* utiliza LDH para manter a capacidade das bactérias em produzir NADH, a partir de NAD⁺, na presença de óxido NO. A mutação da LDH em *S. aureus* caracterizou cepas menos virulentas em modelo murino de infecção, apontando então uma função da LDH na adaptação e persistência de *S. aureus* no hospedeiro (RICHARDSON, et al., 2008; FLANNAGAN, et al., 2015).

Evidentemente *S. aureus* apresenta níveis de patogenicidade superiores à *S. saprophyticus*, por ser uma espécie altamente virulenta e frequentemente relacionada à

infecções graves em seres humanos. Porém é de extrema importância este estudo associativo entre espécie do gênero *Staphylococcus*, visto que pode apontar possíveis mecanismos utilizados por *S. saprophyticus* para garantir sucesso no estabelecimento da infecção e persistência no hospedeiro.

6.1.2 Proteínas secretadas relacionadas à defesa contra o estresse

O sistema imune inato do hospedeiro, é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) com atividade bactericidas, como um mecanismo de defesa imunológica (GREEN, et al., 2014). Diante disso, a expressão de proteínas de defesas contra estresse por microrganismos patogênicos, é essencial para a sua sobrevivência e persistência durante processo infeccioso. Neste estudo, diversas classes de proteínas relacionadas à defesa contra o estresse, foram identificadas no secretoma extracelular dos 3 cepas clínicas de *S. saprophyticus*. Dentre elas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD) ligante de Ferro (Fe) e Manganês (Mn), a catalase, e a alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC).

A superóxido dismutase (SOD), portanto, é uma metalo-enzima que se liga a um cofator, para realizar a sua função antioxidante na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) (RETNONINGRUM, et al., 2016). Esta enzima converte o ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), ou ainda atua evitando a formação de peroxinitrito ($OONO^-$), a partir de superóxido extracelular. Além de participar diretamente no processo de desintoxicação celular, a SOD também pode desempenhar papel na persistência de *S. aureus* durante infecção. Codificada pelos genes *sodA* e *sodM*, a SOD de *S. aureus* apresentou papel fundamental no crescimento e viabilidade celular deste estafilococo, quando encontrado em condições de estresse (VALDERAS & HART, 2001; GAUPP et al., 2012).

Em cepas não patogênicas do gênero *Mycobacterium*, a SOD ligante de Mn apresenta localização citoplasmática, enquanto que nas cepas patogênicas *Mycobacterium tuberculosis* e do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), é encontrada no secretoma extracelular. Desta forma, a SOD presente na superfície do MAC, além de contribuir para a sua sobrevivência no hospedeiro, ajudando na resistência à morte mediada pela liberação de EROs por macrófagos, ela foi descrita como uma adesina que pode modular a invasão a células epiteliais da mucosa respiratória. Por outro lado, a SOD extracelular da *M. tuberculosis* foi apontada como ligante de proteínas *moonlighting* do hospedeiro, como a

GAPDH e aldolase (REDDY & KUMAR, et al., 2000; HENDERSON & MARTIN, 2011; AMBLEE & JEFFERY, 2015), caracterizando então nestes dois modelos o papel da SOD também no processo de aderência celular.

A catalase é uma enzima antioxidante presente em células aeróbicas, que catalisa o H_2O_2 , formando água (H_2O) e O_2 . A presença da catalase é uma característica que distingue os estafilococos dos cocos Gram-positivos do gênero *Streptococcus* (COSGROVE, et al., 2007). Em *S. aureus*, a catalase tem sido considerada como determinante na colonização nasal e persistência no hospedeiro, uma vez que cepas produtoras de baixos níveis de catalase apresentam maior sensibilidade à morte por neutrófilos (COSGROVE, et al., 2007).

A catalase foi descrita na parede celular de *C. albicans*, como uma das oito principais adesinas ligantes de plasminogênio presente na matriz extracelular do hospedeiro. A ativação do plasminogênio, por meio da ligação da catalase a resíduos de lisina C-terminal, pode aumentar potencialmente a capacidade deste fungo patogênico de invadir tecidos do hospedeiro e causar necrose (CROWE, et al., 2003).

Por outro lado, a enzima alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC), da família das peroxirredoxinas, apresenta atividade detoxificante contra H_2O_2 , peróxidos orgânicos e peroxinitrito, utilizando NADH e NADPH como equivalentes redutores (POOLE, 2005; GAUPP et al. 2012). Em *Azospirillum brasiliense*, a mutação do gene *ahpC*, resultou em um fenótipo com alterações das propriedades da parede celular, aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo e mobilidade prejudicada, sugerindo que esta enzima é essencial para a viabilidade celular de *A. brasiliense* (WASIM et al., 2009).

A catalase e a AhpC de cepas de *S. aureus* carreadoras nasais parecem apresentar mecanismos de regulação compensatórios. A deleção do gene codificante da AhpC (*ahpC*) leva ao aumento da resistência ao peróxido de hidrogênio, pela superexpressão do gene codificante da catalase (*kata*), assim como mutações tanto em *kata* como em *ahpC*, leva à defeitos no crescimento *S. aureus* em condições aeróbias. Desta forma, a catalase e a AhpC mostraram desempenhar papéis fundamentais na sobrevivência, persistência e colonização nasal por *S. aureus* (COSGROVE, et al., 2007).

Desta maneira, a presença de proteínas antioxidantes no secretoma extracelular de *S. saprophyticus*, contribui para a sua persistência no hospedeiro, visto que pode conferir proteção tanto contra um possível estresse causado por compostos presentes na urina, como contra a morte provocada por células do sistema imunitário.

6.1.3 Proteínas hipotéticas

Um número relevante de proteínas não classificadas foi encontrado no estudo. Essas moléculas, então denominadas de proteínas hipotéticas, compõem uma classe de proteínas que é abundantemente identificada em estudos proteômicos, e a pouca caracterização funcional, muitas vezes, é devido à falta de um motivo ou domínio que permita a identificação e classificação correta das mesmas. Essas moléculas são identificadas em diversos estudos de larga-escala, apresentando funções preditas até então desconhecidas (CORDWELL, et al., 2002; SILJAMAKI, et al., 2014A; BONAR et al., 2016).

6.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS ENTRE OS CEPAS DE *S. saprophyticus*

6.2.1 O antígeno estafilocócico secretado A (SsaA)

Como mostrado pelas análises de proteômica, a cepa 7108 de *S. saprophyticus* não foi capaz de secretar proteínas classicamente antigênicas, enquanto que as cepas ATCC 15305 e 9325 secretaram para o meio extracelular, 2 antígenos, sendo um deles, um importante fator antigênico denominado de SsaA.

O antígeno SsaA já foi identificado diversas vezes no proteoma de *S. aureus*, porém o seu papel na patogênese de infecções estafilocócicas ainda é desconhecido (MUTHUKRISHNAN, et al., 2011; QUIBLIER, et al., 2013; LIEW, et al, 2015). Por outro lado, o SsaA identificado em *S. epidermidis*, foi responsável por elevada resposta antigênica, quando reagido com soro de pacientes com sepse e endocardite estafilocócica, levantando a hipótese de um papel específico deste antígeno na patogênese destes dois tipos de infecções (LANG, et al., 2000). Além do mais, a SsaA parece ser uma proteína regulada negativamente, pelos sistemas reguladores de fatores de virulência dos estafilococos, Sar (regulador acessório estafilocócico) e agr (gene regulador acessório) (SIBBALD, et al., 2006).

O SsaA foi identificado previamente pelo nosso grupo, como uma proteína altamente imunogênica e predominante no proteoma extracelular de *S. saprophyticus* ATCC 15305, o que levou a necessidade de investigar o seu papel durante processo infeccioso (OLIVEIRA, 2014). Desta forma, em estudo posterior, Rosa demonstrou que a

proteína SsaA de *S. saprophyticus* ATCC 15305 tem a capacidade de interagir com proteínas de macrófagos, além de se dispersar por todo o citoplasma celular da célula fagocítica durante modelo de infecção *ex vivo*, sugerindo assim a atuação de SsaA durante a fagocitose por macrófagos (ROSA, 2016).

O papel da secreção de SsaA durante infecção por *S. saprophyticus* ainda não está claramente elucidado, no entanto a sua atuação na resposta imunológica de camundongos já foi demonstrado. Desta forma, é imprescindível a investigação do papel da SsaA na patogênese de infecções urinárias causadas por *S. saprophyticus*.

6.2.2 Expressão exclusiva de proteases

Proteases ou peptidases é uma classe de enzimas que clivam proteínas, e atuam catalisando a hidrólise das ligações peptídicas, desempenhando funções tanto no processamento intracelular, como na clivagem de peptídeos extracelulares, para a obtenção de nutrientes, durante a privação de carbono e/ou nitrogênio. Elas podem ser divididas em dois subgrupos, dependendo do seu local de ação, podendo ser consideradas exopeptidases ou endopeptidases. As proteases também são classificadas com base nos mecanismos catalíticos, como: aspartil-proteases, metaloproteases, cisteíno-proteases, treonina-proteases, e as serino-proteases (PARENTE, et al., 2005).

Em microrganismos patogênicos, as proteases podem se apresentar como fatores de virulência, atuando na degradação de proteínas do hospedeiro, para facilitar sua invasão e disseminação. O papel fisiológico das proteases durante a colonização do hospedeiro tem sido mostrado como parte de mecanismos de degradação das barreiras da pele e das mucosas, a digestão de proteínas do hospedeiro para fornecer nutrientes e o ataque a linfócitos e macrófagos, enfraquecendo assim as defesas imunitárias do hospedeiro (HUBE, 2000; YANG, 2003). Assim, a presença de peptidases secretadas significa, biologicamente, uma capacidade maior do patógeno em invadir o hospedeiro.

S. aureus também secreta uma variedade de peptidases extracelulares, que parecem estar envolvidas na virulência. Elas são conhecidas por clivar os componentes de defesa do hospedeiro, inclusive o sistema complemento, facilitando então a sua evasão ao sistema imune e disseminação no hospedeiro. As principais proteases secretadas por *S. aureus* consistem na metaloproteinase dependente de zinco, denominada de aureolisina (Aur), serina protease (V8 protease; SspA), cisteína protease (SspB), e a *staphopain* (Scp), uma cisteína protease similar à papaína. A expressão de proteases é intrinsecamente

controlada pelos sistemas reguladores de fatores de virulência, agr e Sar (SHAW, et al., 2004; KANTYKA, et al., 2011).

Como já citado, no exoproteoma de *S. saprophyticus* 7108 foram encontradas 7 peptidases de classes diferentes, sendo 4 delas secretadas exclusivamente por essa cepa. São elas a leucil aminopeptidase, a metionina aminopeptidase, uma aminopeptidase putativa e outra peptidase putativa. A detecção de proteases em extrato proteico secretado é extremamente intrigante, e ao mesmo tempo um dado biologicamente relevante, já que esta identificação é incomum em meios ricos em carbono e nitrogênio. A identificação de peptidases também é difícil devido à capacidade dela se autoclivar, e eventualmente, não ser detectada em estudos proteômicos.

As aminopeptidases, portanto, é uma classe de enzimas proteolíticas que desempenham um papel importante no metabolismo celular, catalisando seletivamente a remoção de resíduos de aminoácidos, a partir da porção N-terminal das proteínas. Tradicionalmente, o papel das aminopeptidases se resume em metabolizar o nitrogênio e em ativar ou degradar proteínas (CARROLL, et al., 2012; CARROLL, et al., 2013).

A leucil aminopeptidase ou leucina aminopeptidase (LAP) de *S. aureus*, uma metalo-aminopeptidase da família M17, foi mostrada, como sendo uma proteína intracelular necessária para a virulência do estafilococo, em inúmeros modelos de infecção em camundongos (CARROLL, et al., 2012). Carroll e colaboradores em 2013 também mostraram que a atividade enzimática da LAP de *S. aureus* é excelente em pH 8,5, na presença dos metais bivalentes Mn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} .

LAP do parasito intracelular *Plasmodium vivax* catalisa a remoção de aminoácidos, a partir de proteínas liberadas pela destruição da hemoglobina e é utilizado como um mecanismo de sobrevivência no hospedeiro. Cepas mutantes de *Plasmodium falciparum* que superexpressam a LAP, são duas vezes mais resistentes à morte por Bestatina, se comparados com cepas tipo selvagem. Estes dados sugerem fortemente o papel da LAP no crescimento e desenvolvimento de microrganismos patogênicos em condições ambientes extremas, além de promover um possível mecanismo de resistência a drogas (SINGH, et al., 2012).

A metionina aminopeptidase (MetAP) é uma metalo-enzima que tem como alvo a excisão catalítica da metionina N-terminal de proteínas recém sintetizadas, necessária para o crescimento e sobrevivência celular de *E. coli* dentro do hospedeiro (KAO, et al., 2011; CHAI, et al., 2011). Chai e colaboradores mostraram que um inibidor da MetAP era capaz de impedir significativamente o crescimento da cepa MRSA de *S.*

aureus, apresentando então a MetAp como um potencial alvo terapêutico de infecções causadas por cepas de *S. aureus* multirresistentes. Por outro lado, a atividade antigênica da MetAP secretada por *S. aureus* foi recentemente apontada por Liew e colaboradores, em ensaios de Western-blotting realizados com anticorpos presentes em soro de pacientes especificamente com infecções de tecidos moles, causados por *S. aureus* (LIEW, et al., 2015).

Desta forma, é de se pensar que *S. saprophyticus* 7108 apresente mecanismos diferenciados para invasão e sobrevivência no hospedeiro humano, pois além de secretar mais proteases, não secreta o antígeno SsaA como as outras cepas analisadas, abrindo então futuras perspectivas no estudo da caracterização das proteases desta cepa, e associação com dados clínicos de pacientes acometidos por esta cepa.

A cepa 9325 não apresentou proteases exclusivas, enquanto que somente *S. saprophyticus* ATCC 15305 foi capaz de secretar uma peptidase, denominada de zinco-metaloprotease. As zinco-metaloproteases ou zinco-metaloproteinases, portanto, se caracterizam pela presença de zinco no seu sítio ativo, o qual atua no posicionamento da molécula de água, responsável pela clivagem hidrolítica do peptídeo (PARENTE, et al., 2005). A metaloprotease dependente de zinco, em *S. aureus* é denominada de aureolisina (Aur), e faz parte da família das termolisinas. A aureolisina de *S. aureus* é apontada como um potente inibidor do sistema complemento, degradando uma proteína central denominada de C3. Desta maneira, a aureolisina parece inibir, de forma eficaz, a fagocitose bacteriana e posterior morte mediada por neutrófilos (LAARMAN, et al., 2011; JUSKO, et al., 2014).

6.2.3 Outras proteínas diferencialmente secretadas

O fator de virulência UafA foi identificado apenas no exoproteoma de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e 7108. Classicamente, a UafA é uma adesina, com atividade de hemaglutinina, ancorada à parede celular de *S. saprophyticus*, responsável por sua aderência ao epitélio geniturinário humano. O processo de adesão é um mecanismo primordial na colonização de patógenos causadores de ITU, visto que a infecção só tem capacidade de progredir, caso o microrganismo seja capaz de se aderir ao epitélio urinário (KURODA, et al., 2005; KING, et al., 2011).

O ácido lipoteicóico, um componente crucial da parede celular em bactérias Gram-positivas, já foi apontado como um fator de virulência em *S. saprophyticus*, por

apresentar atividade de adesina durante a colonização no hospedeiro (TETI, et al.,1987). Uma enzima denominada de ácido lipoteicóico sintase, responsável por catalisar a polimerização do ácido lipoteicóico, foi detectada no proteoma extracelular das cepas ATCC 15305 e 9325 de *S. saprophyticus*, caracterizando então um possível mecanismo adicional de invasão tecidual utilizado por estas duas cepas.

Além do mais, o ácido lipoteicóico derivado de *S. aureus* provoca disfunção endotelial, choque circulatório e lesão de órgãos em diferentes modelos de sepse causadas por bactérias Gram-positivas (LEEMANS et al., 2003; XING et al., 2011). Desta forma, complicações sépticas provocadas por infecções urinárias causadas por *S. saprophyticus* ATCC 15305 e 9325, tendem a apresentar danos mais severos ao hospedeiro, do que a provocada pela cepa 7108.

A detecção de proteínas expostas à superfície em frações extracelulares pode ser devido a uma fraca ligação das mesmas à parede de celular, sendo, portanto, liberados para o meio de cultura, durante centrifugação, podendo ser também secretadas por algum mecanismo ainda desconhecido (SILJAMAKI, et al., 2014A).

Diante dos dados expostos, é possível observar que, mesmo com a diversidade funcional que as proteínas identificadas no exoproteoma de *S. saprophyticus* possam exercer dentro do ambiente intracelular, outras funções já foram descritas, para muitas delas, quando presentes no meio extracelular. Sendo assim, várias das proteínas detectadas no proteoma extracelular de *S. saprophyticus*, são fortes candidatas a desempenhar papéis na promoção da patogênese desta bactéria no trato geniturinário humano.

7 CONCLUSÕES

Este estudo propôs a caracterização do perfil do exoproteoma de 3 cepas clínicas de *S. saprophyticus*, por meio da proteômica comparativa. A análise encontrou diferenças notáveis na expressão de proteínas extracelulares entre as cepas ATCC 15305, 7108 e 9325 de *S. saprophyticus*, mas que corroboram com dados encontrados em *S. aureus*. Das 159 proteínas identificadas no estudo, apenas 44 foram encontradas no exoproteoma das 3 cepas de *S. saprophyticus*. Dentre esses peptídeos, destacam-se: enolase, triose-fosfato isomerase (TPI), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), frutose-bifosfato aldolase, superóxido dismutase (SOD), alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC), L-lactato desidrogenase (LDH) e a transglicosilase IsaA, muitas das quais apresentam funções *moonlighting* relacionadas à característica virulenta de outros microrganismos patogênicos.

A cepa 7108 de *S. saprophyticus* apresentou maior heterogeneidade no perfil de proteínas secretadas, dentre as cepas estudadas. Como evidenciado, um importante fator antigênico, denominado de SsaA, não foi capaz de ser detectado no exoproteoma da cepa 7108, mesmo esta cepa possuindo o gene codificante para SsaA em perfeitas condições. Este dado demonstra a plasticidade metabólica de *S. saprophyticus* 7108, visto que, por conter o gene codificante, o antígeno é produzido pela cepa 7108, porém, eventualmente, não é secretado para o meio extracelular. No exoproteoma de 7108 também foi encontrado um maior número de proteínas exclusivas, se comparado às cepas ATCC 15305 e 9325, totalizando 36. Entre elas, 4 peptidases específicas da cepa foram identificadas, uma classe de enzimas consideradas muitas vezes como fatores de virulência bacteriana, levando-nos então a acreditar que a variedade proteica de 7108 possa interferir na capacidade infectiva desta cepa, em relação às demais.

Desta maneira, a análise do proteoma extracelular de 3 cepas clínicas de *S. saprophyticus* evidenciou uma diversidade na secreção de proteínas, que pode refletir em diferenças tanto na capacidade de infecção, como nas estratégias utilizadas por *S. saprophyticus* para colonizar o hospedeiro humano. Assim, os resultados deste estudo suportam a hipótese de que diferentes cepas de *S. saprophyticus* possuem padrão de secreção de proteínas diferentes, e contribui para o rastreamento da expressão de proteínas relacionadas à virulência e adaptação deste microrganismo à mucosa geniturinária humana.

8 PERSPECTIVAS

1. Avaliar o perfil do exoproteoma de outras cepas clínicas de *S. saprophyticus*.
2. Investigar a sobrevivência de diferentes cepas de *S. saprophyticus* dentro de macrófagos.
3. Analisar o exoproteoma das 3 cepas de *S. saprophyticus*, após modelo de infecção em macrófagos.
4. Avaliar o exoproteoma de cepas de *S. saprophyticus*, em condições anaeróbicas.
5. Analisar secreção de SsaA na cepa 7108, e em outros isolados de *S. saprophyticus*.
6. Elucidar função de SsaA durante a patogênese de infecções por *S. saprophyticus*.
7. Estudar a função das proteases na patogênese de infecções por *S. saprophyticus*.
8. Associar o perfil proteômico das 3 cepas de *S. saprophyticus*, com os dados clínicos dos pacientes acometidos.
9. Padronizar modelos de cultivo em urina sintética.
10. Padronizar modelos de infecção *in vivo*, por *S. saprophyticus*.
11. Prever assinatura genética de diferentes cepas de *S. saprophyticus*.

9 REFERÊNCIAS

ABBY, S.S.; CURY, J.; GUGLIELMINI, J.; NÉRON, B.; TOUCHON, M; ROCHA, E.P.C. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. **Scientific Reports**, 2016.

AMBLEE, V.; JEFFERY, C. J. Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface. **Plos One**, 2015.

ANDREU, A.; CACHO, J.; COIRA, A.; LEPE, J. A. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinário. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, p.52-57. 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo 5. Ministério da Saúde.

BAILÃO, E.F.; PARENTE, J.A.; PIGOSSO, L.L.; DE CASTRO, K.P.; FONSECA, F.L.; SILVA-BAILÃO, M.G.; BÃO, S.N.; BAILÃO, A.M.; RODRIGUES, M.L.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J.G.; SOARES, C.M. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, 2014.

BASELL, K.; Otto, A.; Junker, S.; Zuhlke, D.; Rappen, G. M.; Schmidt, S. The phosphoproteome and its physiological dynamics in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p.121-132, 2014.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 870-926, 2014.

BLAU, K.; PORTNOI, M.; SHAGAN, M.; KAGANOVICH, A.; ROM, S.; KAFKA, D.; CHALIFA-CASPI, V.; PORGADOR, A.; GIVON-LAVI, N.; GERSHONI, J.M.; DAGAN, R.; MIZRACHI-NEBENZAHL, Y. Flamingo cadherin: a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p.1828-1837, 2007.

BONAR, E.; WOJCIK, I.; JANKOWSKA, U.; KEDRACKA-KROK, S.; BUKOWSKI, M.; POLAKOWSKA, K.; LIS, M. H.; KOSECKA-STROJEK, M.; SABAT, A.J.; DUBIN, G.; FRIEDRICH, A. W.; MIEDZOBRODZKI, J.; DUBIN, A.; WLADYKA, B. Identification of Secreted Exoproteome Fingerprints of Highly-Virulent and Non-Virulent *Staphylococcus aureus* Strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016.

BRÖKER, B. M.; BELKUM, A. Immune proteomics of *Staphylococcus aureus*. **Proteomics**, v. 11, p. 3221-3231, 2011.

CARNEIRO, C.R.; POSTOL, E.; NOMIZO, R.; REIS, L.F.; BRENTANI, R.R. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 6, p.604-608, 2004.

CARROLL, R. K.; VEILLARD, F.; GAGNE, D. T.; LINDENMUTH, J. M.; POREBA, M.; DRAG, M.; POTEMPA, P.; SHAW, L. N. The *Staphylococcus aureus* leucine aminopeptidase LAP is localized to the bacterial cytosol and demonstrates a broad substrate range that extends beyond leucine. **Biological Chemistry**, v. 394, p.791-803, 2013.

CARROLL, R.K.; ROBISON, T.M.; RIVERA, F.E.; DAVENPORT, J.E.; JONSSON, I.M.; FLORCZYK, D.; TARKOWSKI, A.; POTEMPA, J.; KOZIEL, J.; AND SHAW, L.N. Identification of an intracellular M17 family leucine aminopeptidase that is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v.14, 989-999, 2012.

CARVALHO, A.J. **Identificação de proteínas de superfície de *staphylococcus saprophyticus* e análise de fatores de virulência**. Dissertação (Mestrado de Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal de Goiás, 2014.

CORDWELL, S. J.; LARSEN, M. R.; COLE, R. T.; WALSH, B. J. Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100. **Microbiology**, v. 148, p.2765-2781, 2002.

COSGROVE, K.; COUTTS, G.; JONSSON, I. G.; TARKOWSKI, A.; KOKAI-KUN, J. F.; MOND, J. J.; FOSTER, S. J. Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 189, p.1025-1035, 2007.

CRISTINO, J.M. *Staphylococcus*. In: FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.F. **Microbiologia**. Lisboa: Lidel, v. 29, p. 39-49, 2000.

CROWE, J.D.; SIEVWRIGHT, I.K.; AULD, G.C.; MOORE, N.R.; GOW, N.A.; BOOTH, N.A. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Molecular Microbiology**, v. 47, p.1637-1651, 2003.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. **Nature Biotechnology**, v. 28, p.710-721, 2010.

DREISBACH, A.; HEMPEL, K.; BUIST, G.; HECKER, M.; BECHER, D.;VAN DIJL, J. M. Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus*. **Proteomics**, v. 10, p. 3082-96, 2010.

DREISBACH, A.; VAN DIJL, J.M.; BUIST, G. The cell surface proteome of

Staphylococcus aureus. **Proteomics**, v. 11, p. 1-15, 2011.

ECONOMOU, A. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 19, 159-169, 2002.

EUZÉBY, J.P. **LPSN**: List of prokariotic names with standing in nomenclature. Disponível em <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>, acesso em 19 de Julho de 2016.

FARIÑA, N.; CARPINELLI, L.; SAMUDIO, M.; GUILLÉN, R.; LASPINA, F.; SANABRIA, R.; ABENTE, S.; RODAS, L.; GONZÁLEZ, P.; KASPAR, H.M.D. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clinicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulência. **Revista Chilena Infectologia**, v. 30, p.480-488, 2013.

FERREIRA A.M.; BONESSO M.F.; MONDELLI, A.L.; CUNHA, M.R.L.S.; Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S–23S interspace region molecular weight patterns. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91 p.406-411, 2012.

FERREIRA, C.R.; POSTOL, E.; NOMIZO, R.; REIS, L.F.; BRENTANI, R.R. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 6, p.604-608, 2004.

FLANNAGAN, R. S.; HEIT, B.; HEINRICHS, D.E. Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 4, p.826-868, 2015.

GATERMANN, S.; JOHN, J.; MARRE, R. *Staphylococcus saprophyticus* urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. **Infection and Immunity**, v. 57, p.110-6, 1989b.

GATERMANN, S.G. Virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and enterococci. In: MOBLEY, H.L.T., WARREN, J.W. (eds) **Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management**. Washington, DC: ASM: p. 313-340, 1986.

GATERMANN, S.G.; KREFT, B.; MARRE, R.; WANNER, G. Identification and characterization of a Surface-associated protein Ssp of *Staphylococcus saprophyticus*. **Infect. Immunity**, v. 60, p.1055-1060, 1992.

GAUPP, R.; LEDALA, N.; SOMERVILLE, G.A. Staphylococcal response to oxidative stress. **Frontier Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p.1-19, 2012.

GEROMANOS, S.J.; VISSERS, J.P.; SILVA, J.C.; DORSCHER, C.A.; LI, G.Z.; GORENSTEIN, M.V.; BATEMAN, R.H.; LANGRIDGE, J.I. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependent LC-MS/MS. **Proteomics**, v. 9, p. 1683-1695, 2009.

GREEN, J.; ROLFE, M. D; SMITH, L. J. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. **Virulence**, v. 5, p.794-809, 2014.

GRUMANN, D.; NÜBEL, D.; BRÖKER, B.M. Staphylococcus aureus toxins – Their functions and genetics. **Infections, genetic and evolution**, v. 21, p. 583-592, 2014.

GUPTA K. ; SCHOLLES, D.; STAMM, W.E. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. **Journal of the American Medical Association**, v. 281, p.736-738, 1999.

HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário – Itu. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 49, p.109-116, 2003.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking Bacterial Moonlighting Proteins Are Virulence Determinants in Infectious Disease. **Infection and Immunity**, v. 79, p.3476-3491, 2011.

HIGASHIDE, M.; KURODA, M.; OMURA, C.T.N.; KUMANO, M.; OHKAWA, S.; ICHIMURA, S.; OHTA, T. Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* Isolates Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome mec Have Emerged in Urogenital Tract Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p.2061-2068, 2008.

HUBE, B. Exocellular proteases of human pathogenic fungi. **Contributions to Microbiology**, v. 5, p.126-137, 2000.

ISHIHARA, S.; YOKOI, S.; ITO, M.; KOBAYASHI, S.; DEGUCHI, T. Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections. **Urology**, v. 57, p. 17-20, 2001.

ISLAM, N.; KIM, Y.; ROSS, J. M.; MARTEN, M. R. Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm cells grown under physiologically relevant fluid shear stress conditions. **Proteome Science**, 2014.

JAMESDANIEL, S.; SALVI, R.; COLLING, D. Auditory proteomics: Methods, accomplishments and challenges. **Brain Research**, v. 11, p. 24-36, 2009.

JORDAN, E. O. The production by staphylococci of a substance causing food poisoning.

Journal of the American Medical Association, v.94, p. 1648-1650, 1930.

JUNG Y.J.; KOH, Y.; HONG, S.B.; CHUNG, J.W.; CHOI, S.H.; KIM, N.J.; KIM, M.N. CHOI, I.S.; HAN, A.Y.; KIM, W.D.; YUN, S.C.; LIM, C.M. Effect of vancomycin plus rifampicin in the treatment of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. **Critical Care Medicine**, v. 38, p.175-180, 2010.

JUSKO, M.; POTEPA, J.; KANTYKA, T.; BIELECKA, E.; MILLER, H. K.; KALINSKA, K.; DUBIN, G.; GARRED, P.; SHAW, L.N.; BLOM, A.M. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, p.31-46, 2014.

KANTYKA, T.; SHAW L.N.; POTEPA, J. Papain-like proteases of *Staphylococcus aureus*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712 p.1-14, 2011.

KIM, H. K.; THAMMAVONGSA, V.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, p.92-99, 2012.

KIM, H.K.; EMOLO, C.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. A monoclonal antibody that recognizes the E domain of staphylococcal protein A. **Vaccine**, v. 32, p.464-469, 2014.

KING, N. P; BEATSON, S.A.; TOTSIKA, M.; ULETT, G.C.; ALM, R.A.; MANNING, P.A.; SCHEMBRI, M.A. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. **Microbiology**, v.157, p.1161-1175, 2011.

KING, N.T.; SAKINÇ, T.; ZAKOUR, N.L.B; TOTSIKA, M.; HERAS, B.; SIMERSKA, P.; SHEPHERD, M.; GATERMANN, S.G.; BEATSON, S. A., SCHEMBRI, M. A. Characterisation of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

KLEINE, B.; ALI, L.; WOBSERA, D.; SAK, T. The N-terminal repeat and the ligand binding domain A of SdrI protein is involved in hydrophobicity of *S. saprophyticus*. **Microbiological Research**, v. 172, p.88-94. 2015.

KLEINE, B.; GATERMANN, S.; SAKINC, T. Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates. **BMC Research Notes**, v. 3, 2010.

KLINE, K.A.; INGERSOLL, M.A.; NIELSEN, H.V.; SAKINC., T.; HENRIQUES-NORMARK, B.; GATERMANN, S.; CAPARON, M.G. AND HULTGREN, S.J. Characterization of a novel murine model of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract

infection reveals roles for Ssp and SdrI in virulence. **Infection and Immunity**, v. 78, p.1943-1951, 2010.

KORTE-BERWANGER, M.; SAKINC, T; KLINE, K.; NIELSEN, H.V.; HULTGREN, S.; GATERMANN, S.G. Significance of the D-serine-deaminase and D-serine metabolism of *Staphylococcus saprophyticus* for virulence. **Infection and Immunity**, v. 81, p.4525-4533, 2013.

KURODA, M.; YAMASHITA, A.; HIRAKAWA, H.; KUMANO, M.; MORIKAWA, K.; HIGASHIDE, M.; MARUYAMA, A.; INOSE, Y.; MATOBA, K.; TOH, H.; KUHARA, S.; HATTORI, M.; OHTA, T. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 102, p.13272-13277, 2005.

KUSCH, H.; ENGELMANN, S. Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304 p. 133-141, 2014.

LAARMAN, A.J.; RUYKEN, M.; MALONE, C.L.; VAN STRIJP, J.A.; HORSWILL, A.R.; ROOIJAKKERS, S.H. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement c3 to mediate immune evasion. **Journal of Immunology**, v.186, p.6445-6453, 2011.

LANG, S.; LIVESLEY, M.A.; LAMBERT, P.A.; LITTLER, W.A.; ELLIOTT, T.S. Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.29, p.213-220, 2000.

LEE, T.F; LEE,H.; CHEN, C.M; DU, S.H;CHENG, Y.C.;HSU, C.C.;CHUNG, M.Y.;TENG, S.H.; TENG, L.J.; HSUEHA, P.R. Comparison of the Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry with That of Other Commercial Identification Systems for Identifying *Staphylococcus saprophyticus* in Urine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 1563-1566, 2013.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes & Development**, v. 15, p.1725-1752, 2001.

LEEMANS J. C.; HEIKENS M, VAN KESSEL KPM, FLORQUIN S, VAN DER POLL T. Lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice. **Clinical and Diagnostic Laboratorial Immunology**, v. 10, p.950-953, 2003.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D. **Mark's Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

LIEW, Y. K.; HAMAT, R. A.; BELKUM, A. V.; CHONG, P.P.; NEELA, V. Comparative Exoproteomics and Host Inflammatory Response in *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections, Bacteremia, and Subclinical Colonization. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, p.593-603, 2015.

LING, E.; FELDMAN, G.; PORTNOI, M.; DAGAN, R.; OVERWEG, K.; MULHOLLAND, F.; CHALIFA-CASPI, V.; WELLS, J.; MIZRACHI-NEBENZAHL, Y. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, p.290-298, 2004.

LO, D.S.; SHIEH, H.H.; BARREIRA, E.R.; RAGAZZI, S. L. B.; GILIO, A.E. High frequency of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections among female adolescents. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, p. 1023-1025, 2015.

LOES, A.N.; RUYLE, L.; ARVIZU, M.; GRESKO, K.E.; WILSON, A.L.; DEUTCH, C.E. Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, p.31-41, 2013.

LORENZ, U.; LORENZ, B.; SCHMITTER, T.; STREKER, K.; ERCK, C.; WEHLAND, J.; NICKEL, J.; ZIMMERMANN, B.; OHLSEN, K. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p.165-173, 2011.

LORENZ, U.; LORENZ, B.; SCHMITTER, T.; STREKER, K.; ERCK, C.; WEHLAND, J.; NICKEL, J.; ZIMMERMANN, B.; OHLSEN, K. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p.165-173, 2011.

LUDWIG, W.; KLENK, H.P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics In: BOONE D.R.; CASTENHOLTZ, R.W.; GARRITY, G.M. (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Springer**, 2001.

MARIAPPAN, V.; VELLASAMY, K.M.; THIMMA, J.S.; HASHIM, O.H.; VADIVELU, J. Identification of immunogenic proteins from *Burkholderia cepacia* secretome using proteomic analysis. **Vaccine**, v. 28, p.1318-1324, 2010.

MARTINS, M. J. B. P. ***Staphylococcus* - estudo epidemiológico numa unidade hospitalar do norte**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade de Aveiro, 2009.

MATSUOKA, E.; TANAKA Y.; KURODA, M.; SHOUJI, Y.; OHTA, T.; TANAKA, I.; YAO, M. Crystal structure of the functional region of Uro-adherence factor A from *Staphylococcus saprophyticus* reveals participation of the B domain ligand binding.

Protein Science, v. 20, p. 406-416, 2011.

MATSUOKA, E.; TANAKA, Y.; KURODA, M.; SHOUJI, Y.; OHTA, T.; TANAKA, I.; YAO, M. Crystal structure of the functional region of Uro-adherence factor A from *Staphylococcus saprophyticus* reveals participation of the B domain in ligand binding. **Protein Science**, v. 20, p.406-416, 2011.

MIMICA, M.J.; BEREZIN, E.N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arquivo Médico dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa São Paulo**, v. 51, p. 52-56, 2006.

MONTEIRO, R.; VITORINO, R.; DOMINGUES P.; RADHOUANI, H.; CARVALHO, C.; POETA, C.; TORRES, C.; IGREJAS, G. Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2892-2915, 2012.

MURAD, A.M.; RECH, E.L. NanoUPLC-MS^E proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnology**, v. 12, 2012.

MURAD, A.M., SOUZA, G.H., GARCIA, J.S., RECH, E.L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **Journal of Separation Science**, v. 34, p.2618-2630, 2011.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948p.

MUTHUKRISHNAN, G.; QUINN, G.A; LAMERS, R.P; DIAZ, C.; COLE, A.L; CHEN, S; COLE, A.M. Exoproteome of *Staphylococcus aureus* Reveals Putative Determinants of Nasal Carriage. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 2064-2078, 2011.

NEIDHARDT, F. C. How microbial proteomics got started. **Proteomics**, v. 11, p. 2943-2946, 2011.

OHLSSEN, K.; LORENZ, U. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal Infections. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p.402–410, 2010.

OLIVEIRA, L.S. **Perfil do exoproteoma e identificação de proteínas imunogênicas secretadas por *Staphylococcus saprophyticus***. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública). Universidade Federal de Goiás, 2014.

ORDEN-MARTÍNEZ, B.; MARTÍNEZ-RUIZ, R.; MILLÁN-PÉREZ, R. ¿Qué estamos aprendiendo de *Staphylococcus saprophyticus*? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**,v. 26, p.495-499, 2008.

OTTO, A.; BERNHARDT, J.; HECKER, M.; BECHER, D. Global relative and absolute quantitation in microbial proteomics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, p.364-372, 2012.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the “accidental” pathogen. **Nature Review Microbiology**, v. 7, p.555-567, 2009.

PARENTE, J.A.; COSTA, M.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases. **Genetics and Molecular Research**. v. 4, p.358-371, 2005.

PARENTE-ROCHA, J. A.; PARENTE, A. F. A; BAEZA, L. C.; BONFIM, S. M. R. C.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J. G.; BAILÃO, A. M.; TABORDA, C. P.; LUIZ BORGES, C. L.; SOARES, C.M.A. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. **Plos One**, v. 10, 2015.

PARK, S.; KELLEY, K.A.; VINOGRADOV, E.; SOLINGA, R.; WEIDENMAIER, C.; MISAWA, Y.; LEE, J.C. Characterization of the Structure and Biological Functions of a Capsular Polysaccharide Produced by *Staphylococcus saprophyticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 92, p.4618-4626, 2010.

PEREIRA, A. P. Coagulase-negative strains of staphylococcus possessing antigen 51 as agents of urinary infection. **Journal of Clinical Pathology**, v.15, p.252-253, 1962.

PEREIRA, L.A.; BÁO, S.N.; BARBOSA, M.S.; SILVA, J.L.M.; FELIPE, M.S.S.; SANTANA, J.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; SOARES, C.M. A. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Research**, v.7, p.1381-1388, 2007.

PIGOSSO, L. L.; PARENTE, A. F. A, Coelho, A. S. G.; Silva L. P.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M; SOARES, C.M.A. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p.87–100, 2013.

POOLE, L. B. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch. Biochem. Biophysical Journal*, v. 433, p.240-254, 2005.

PORCHERON, G.; GARÉNAUX, A.; PROULX, J.; SABRI, M.; DOZOIS, C.M. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, 2013.

PRIYA, R.; MYTHILI, A.; SINGH, Y.R.B.; SREEKUMAR, H.; MANIKANDAN, P.; PANNEERSELVAM, K.; SHOBANA, C.S. Virulence, Speciation and Antibiotic Susceptibility of Ocular Coagulase Negative Staphylococci (CoNS). **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, p.33-37, 2014.

QUIBLIER, C.; SEIDL, K.; ROSCHITZKI, B. Secretome Analysis Defines the Major Role of SecDF in *Staphylococcus aureus* Virulence. **Plos One**, v. 8, 2013.

RAJALINGAM, D.; LOFTIS, C.; XU, J. J.; KUMAR, T. K. S. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. **Protein science**, v. 18, p.980-993, 2009.

RAZ, R.; RAUL, R.; AND KUNI, C.M. Who Are You - *Staphylococcus saprophyticus*? **Brief Report**, v. 40, p.896-898, 2005.

REDDY, V.M.; KUMAR, B. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. **J Infect Dis**, v. 181, p.1189-93, 2000.

RETNONINGRUM, D., S.; RAHAYU, A., P.; MULYANTI, A.; DITA, A.; VALERIUS, O.; ISMAYA, W. T. Unique Characteristics of Recombinant Hybrid Manganese Superoxide Dismutase from *Staphylococcus equorum* and *S. saprophyticus*. **Protein Journal**, v.35, p.136 -144, 2016.

RICHARDSON, A.R.; LIBBY, S.J.; FANG, F.C. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. **Science**, v. 319, p.1672-1676, 2008.

ROSA, I.I.R. **Clonagem e expressão heteróloga do antígeno ssaa de *staphylococcus saprophyticus* e avaliação da secreção durante interação com macrófagos**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal de Goiás, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**. 3rd edition. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANKINC, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S.G. SdrI, a Serine-Aspartate Repeat Protein Identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. **Infection and Immunity**, V. 74, p.4615-4623, 2006.

SANKINC, T.; WOZNOWSKI, M.; EBSEN, M.; GATERMANN, S.G. The surface associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. **Infection and Immunity**. 73, 6419-6428, 2005.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A; AFONSO, I.F; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SCHLEIFER; K.H.; KLOOS, W. E. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 25, p. 50-61, 1975.

SCHLIEVERT, P. M.; SHANDS, K. N.; DAN, B.B.; SCHMID, G.P.; NISHIMURA, R. D. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. **Journal of Infection. Dis.**, v. 143, p.509-516, 1981.

SHAW, L.; GOLONKA, E.; POTEPA, J.; FOSTER, S. J. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v.150, p.217–228 2004.

SIBBALD, M.J.J.B.; ZIEBANDT, A K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M.; DE JONG, A.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; STOKROOS, I.; ARENDS, J.P.; DUBOIS, J.Y.F.; VAN DIJL, J.M. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 70, p.755-88, 2006.

SILJAMAKI, P.; VARMANEN, P.; KANKAINEN, M., SUKURA, A.; SAVIJOKI, K.; NYMAN, T. A. Comparative proteome profiling of bovine and human *Staphylococcus epidermidis* strains for screening specifically expressed virulence and adaptation proteins. **Proteomics**, v. 1, p.1890-1894, 2014B.

SILJAMAKI, P.; VARMANEN, P.; KANKAINEN, M.; SUKURA, A.; SAVIJOKI, K.; NYMAN, T.A. Comparative exoprotein profiling of different *Staphylococcus epidermidis* strains reveals potential link between nonclassical protein export and virulence. **Journal of Proteome Research**, p.3249-32496, 2014A.

SINGH, V.K.; SYRING, M.; SINGH, A.; SINGHAL, K.; DALECKI, A.; JOHANSSON, T. An insight into the significance of the DnaK heat shock system in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.302, p.242-252, 2012.

SODERQUIST, B.; BERGLUND, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 1176-1178, 2009.

SONG, C.; KUMAR, A.; SALEH, M. Bioinformatic comparison of bacterial secretomes. **Genomics proteomics bioinformatics**, v.7 p.37-46 2009.

STEMERDING, A.M.; KOHL, J.; PANDEY, M.K; KUIPERS, A; LEUSEN, J.H; BOROSS, P.; NEDEREND, M.; VIDARSSON, G.; WEERSINK, A.Y.L; VAN DE

WINKEL, J.G.J.; VAN KESSEL, K.P.M.; VAN STRIJP, J.A.G. *Staphylococcus aureus* formyl peptide receptor-like 1 inhibitor (FLIPr) and its homologue FLIPr-like are potent Fc γ R antagonists that inhibit IgG-mediated effector functions. **Journal of Immunology**, 2013.

SZABADOS, F.; BRITTA KLEINE, B.; ANDERS, A.; KAASE, M. SANKINÇ, T.; SCHMITZ, I.; GATERMANN, S. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, p.163-169, 2008.

TETI, G.; CHIOFALO, M.S.; TOMASELLO, F.; FAVA, C.; MASTROENI, P. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* adherence to uroepithelial cells by lipoteichoic acid. **Infection and Immunity**, V.55, p.839-842, 1987.

TRIVEDI, M. K.; BRANTON, B. A.; TRIVEDI, D.; NAYAK, B.; MONDAL, S.C.; JANA, S. Antimicrobial Sensitivity, Biochemical Characteristics and Biotyping of *Staphylococcus saprophyticus*: An Impact of Biofield Energy Treatment. **Journal of Women's Health Care**, v. 4, 2015.

VALDERAS, M.W.; HART, M.E. Identification and Characterization of a Second Superoxide Dismutase Gene (sodM) from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p.3399-3407, 2001.

VITKO, N. P.; GROSSER, M. R.; KHATRI, D.; LANCE, T.R.; RICHARDSON, A. R. Expanded Glucose Import Capability Affords *Staphylococcus aureus* Optimized Glycolytic Flux during Infection. **MBio**, v. 7, p.296-316, 2016.

WALLMARK, G.; ARREMARK, I.; TELANDER, B. *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. **Journal of Infectious Diseases**, v.138, p.791-797, 1978.

WEBER, S. S.; PARENTE, A. F. A; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C.M.A. Analysis of the Secretomes of *Paracoccidioides* Mycelia and Yeast Cells. **Plos One**, 2012.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p. 221-271, 1987.

XING, J.; MOLDOBAEVA, N.; BIRUKOVA, A.A. Atrial natriuretic peptide protects against *Staphylococcus aureus*-induced lung injury and endothelial barrier dysfunction. **J Applied Physiology**, v. 110, p.213-224, 2011.

YAMAGUCHI, M.; IKEDA, R.; NISHIMURA, M.; KAWAMOTO, S. Localization by scanning immunoelectron microscopy of triosephosphate isomerase, the molecules

responsible for contact-mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus*. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p.368-370, 2010.

YANG, Y.L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p.223-228, 2003.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v.150, p. 12-22, 2013.

ZIEBANDT, A.; KUSCH, H.; DEGNER, M.; JAGLITZ, S.; SIBBALD, M.J.; ARENDS, J.P.; CHLEBOWICZ, M.A.; ALBRECHT, D.; PANTUCEK, R.; DOSKAR, J.; ZIEBUHR, W.; BRÖKER, B.M.; HECKER, M.; VAN DIJL, J.M.; ENGELMANN, S. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. **Proteomics**, v. 10, p.1634-1644, 2010.

ZÜHLKE, D.; DÖRRIES, K.; BERNHARDT, P.; MAA, S.; MUNTE, J.; LIEBSCHER, V.; PANÉ-FARRÉ, J.; RIEDEL, K.; LALK, M.; VÖLKER, U.; ENGELMANN, S.; BECHER, D.; FUCHS, S.; HECKER, M. Costs of life – Dynamics of the protein inventory of *Staphylococcus aureus* during anaerobiosis. **Scientific Reports** 6, 2016.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Expressão de proteínas de *S. saprophyticus* 9325 em relação à *S. saprophyticus* 7108.

Accession	OK	Description	Score	Frac_9325:Frac_7108_Ratio	Frac_9325:Frac_7108_P
CH10_STAS1	2	10 kDa chaperonin OS=Staphylococcus sapro	23604,16	0,182683515	0
GPMA_STAS1	2	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phospho	27855,98	0,364218983	0
GPMI_STAS1	2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosph	5608,84	Frac_7108	Frac_7108
RS10_STAS1	2	30S ribosomal protein S10 OS=Staphylococc	1446,29	6,049647176	1
RS12_STAS1	2	30S ribosomal protein S12 OS=Staphylococc	2981,56	Frac_9325	Frac_9325
RS16_STAS1	2	30S ribosomal protein S16 OS=Staphylococc	2873,1	0,402524213	0
RS18_STAS1	2	30S ribosomal protein S18 OS=Staphylococc	2693,94	Frac_9325	Frac_9325
RS19_STAS1	2	30S ribosomal protein S19 OS=Staphylococc	10397,65	Frac_7108	Frac_7108
RS5_STAS1	2	30S ribosomal protein S5 OS=Staphylococcus	2236,92	Frac_9325	Frac_9325
RS6_STAS1	2	30S ribosomal protein S6 OS=Staphylococcus	7906,74	0,565525443	0
RS7_STAS1	2	30S ribosomal protein S7 OS=Staphylococcus	10080,62	Frac_9325	Frac_9325
RS8_STAS1	2	30S ribosomal protein S8 OS=Staphylococcus	2559,01	Frac_9325	Frac_9325
HPS1_STAS1	2	3-hexulose-6-phosphate synthase 1 OS=Stap	6613,03	Frac_7108	Frac_7108
HPS2_STAS1	2	3-hexulose-6-phosphate synthase 2 OS=Stap	6462,5	Frac_7108	Frac_7108
Q49WB7_STAS1	2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] syntha	4043,48	0,733446954	0
RL19_STAS1	2	50S ribosomal protein L19 OS=Staphylococc	2770,94	Frac_9325	Frac_9325
RL2_STAS1	2	50S ribosomal protein L2 OS=Staphylococcus	1284,63	0,860707971	0,04
RL21_STAS1	2	50S ribosomal protein L21 OS=Staphylococc	1924,41	Frac_7108	Frac_7108
RL22_STAS1	2	50S ribosomal protein L22 OS=Staphylococc	3783,98	Frac_7108	Frac_7108
RL23_STAS1	1	50S ribosomal protein L23 OS=Staphylococc	1069,14	Frac_9325	Frac_9325
RL25_STAS1	2	50S ribosomal protein L25 OS=Staphylococc	9484,02	0,588604987	0
RL27_STAS1	2	50S ribosomal protein L27 OS=Staphylococc	3553,65	Frac_7108	Frac_7108
RL29_STAS1	2	50S ribosomal protein L29 OS=Staphylococc	37437,55	0,600495585	0
RL30_STAS1	2	50S ribosomal protein L30 OS=Staphylococc	13315,13	0,232236266	0

RL32_STAS1	2	50S ribosomal protein L32 OS=Staphylococc	4597,64	Frac_7108	Frac_7108
RL35_STAS1	2	50S ribosomal protein L35 OS=Staphylococc	8005,73	Frac_7108	Frac_7108
RL36_STAS1	2	50S ribosomal protein L36 OS=Staphylococc	5947,49	Frac_7108	Frac_7108
RL5_STAS1	2	50S ribosomal protein L5 OS=Staphylococcus	6764,04	Frac_9325	Frac_9325
RL7_STAS1	2	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Staphyloco	28421,32	0,50157607	0
CH60_STAS1	2	60 kDa chaperonin OS=Staphylococcus sapro	13896,07	0,522045789	0
Q49XV6_STAS1	2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decar	8558,83	0,440431658	0
Q4A0L3_STAS1	2	ABC-type amino acid transport system pe	1916,99	0,477113911	0
Q49ZE7_STAS1	2	Adenylate kinase OS=Staphylococcus sapr	4956,53	0,34645583	0
ASP23_STAS1	2	Alkaline shock protein 23 OS=Staphylococ	2128,81	Frac_9325	Frac_9325
AHPC_STAS1	2	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C O	73486,92	0,467666431	0
GATC_STAS1	2	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotran	1326,5	0,175520399	0
Q49WH3_STAS1	2	Bifunctional autolysin OS=Staphylococcu	10517,48	2,773194711	1
CATA_STAS1	2	Catalase OS=Staphylococcus saprophyticus	4387,45	0,644036423	0
Q49WM0_STAS1	1	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase co	1130,77	Frac_7108	Frac_7108
Q49WM1_STAS1	2	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Staphylo	26038,2	0,301194198	0
RPOA_STAS1	2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1724,43	Frac_7108	Frac_7108
EFTS_STAS1	2	Elongation factor Ts OS=Staphylococcus sa	24048,72	0,440431658	0
EFTU_STAS1	2	Elongation factor Tu OS=Staphylococcus sa	2706,02	1,87761057	1
ENO_STAS1	2	Enolase OS=Staphylococcus saprophyticus su	6237,36	1,138828378	1
FTN_STAS1	2	Ferritin OS=Staphylococcus saprophyticus s	13459,24	0,467666431	0
Q49Z72_STAS1	2	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Staph	3962,24	0,860707971	0
Q49ZH5_STAS1	2	Glucose-1-dehydrogenase OS=Staphylococc	1543,53	1,840431425	1
Q49XV2_STAS1	2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=	5142,35	Frac_7108	Frac_7108
G6PI_STAS1	2	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Staphylo	15861,95	0,625002269	0
Q49XA2_STAS1	2	Glutamine synthetase OS=Staphylococcus	3273,42	Frac_7108	Frac_7108
Q4A0H6_STAS1	2	Glutamyl endopeptidase OS=Staphylococcu	1574,47	1,584073998	1
Q49VZ9_STAS1	2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas	3380,79	4,014849996	1
GCSH_STAS1	2	Glycine cleavage system H protein OS=Stap	4284,68	0,571209062	0

Q4A0W2_STAS1	2	Immunodominant antigen OS=Staphylococcu	7191,69	0,576949804	0
Q49YS4_STAS1	2	Leucyl aminopeptidase OS=Staphylococcus	2553,56	Frac_7108	Frac_7108
Q49W50_STAS1	2	Lipoprotein OS=Staphylococcus saprophyt	2727,01	Frac_7108	Frac_7108
LTAS_STAS1	2	Lipoteichoic acid synthase OS=Staphylococ	5619,15	Frac_9325	Frac_9325
LDH_STAS1	2	L-lactate dehydrogenase OS=Staphylococcus	2755,56	4,349235265	1
SLE1_STAS1	2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sle1 O	1256,34	Frac_9325	Frac_9325
Y1834_STAS1	2	NADH dehydrogenase-like protein SSP1834	3427,51	Frac_9325	Frac_9325
NDK_STAS1	2	Nucleoside diphosphate kinase OS=Staphyloc	2800,03	Frac_7108	Frac_7108
OHRL1_STAS1	2	Organic hydroperoxide resistance protein	1312,66	Frac_9325	Frac_9325
Q49WL6_STAS1	2	Peptide deformylase 2 OS=Staphylococcus	3633,64	Frac_7108	Frac_7108
Q49WK6_STAS1	1	Phosphocarrier protein HPr OS=Staphyloc	1220,97	Frac_7108	Frac_7108
PGK_STAS1	2	Phosphoglycerate kinase OS=Staphylococcus	1161,68	2,054433269	1
Q49VE1_STAS1	2	Phosphotransacetylase OS=Staphylococcus	3529,3	Frac_7108	Frac_7108
RPOE_STAS1	2	Probable DNA-directed RNA polymerase subu	6199,2	Frac_7108	Frac_7108
PPAC_STAS1	2	Probable manganese-dependent inorganic py	1251,11	Frac_7108	Frac_7108
Y1389_STAS1	2	Probable tautomerase SSP1389 OS=Staphylo	2268,51	Frac_7108	Frac_7108
TPX_STAS1	2	Probable thiol peroxidase OS=Staphylococcu	9221,36	0,576949804	0
SCED1_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 1 OS=Stap	10792,65	9,115716741	1
SCED2_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 2 OS=Stap	25581,96	4,220696059	1
SCED3_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 3 OS=Stap	10792,65	9,115716741	1
Q49Z85_STAS1	2	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-ty	6358,05	0,543350861	0
Q49YH6_STAS1	2	Putative aminopeptidase OS=Staphylococc	1664,74	Frac_7108	Frac_7108
Q49XQ2_STAS1	1	Putative cell division initiation prote	1675,95	Frac_7108	Frac_7108
Q49Y87_STAS1	2	Putative cell-shape determining protein	1165,57	Frac_7108	Frac_7108
Q49WI6_STAS1	2	Putative flavohemoprotein OS=Staphyloco	2385,44	Frac_9325	Frac_9325
Q49WC9_STAS1	2	Putative oligopeptidase OS=Staphylococc	5259,1	0,537944435	0
Q49XX4_STAS1	2	Putative peptidase OS=Staphylococcus sa	2608,88	Frac_7108	Frac_7108
PPI1_STAS1	2	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomer	2311,29	Frac_7108	Frac_7108
Q49ZL8_STAS1	2	Putative secretory antigen OS=Staphyloc	4649,24	Frac_9325	Frac_9325

SP5G_STAS1	2	Putative septation protein spoVG OS=Staph	1899,64	Frac_9325	Frac_9325
Q49ZX5_STAS1	2	Putative small heat shock protein OS=St	1918,15	Frac_7108	Frac_7108
Q49W43_STAS1	2	Putative thioredoxin OS=Staphylococcus	16221,01	Frac_7108	Frac_7108
Q49YL0_STAS1	2	Putative transaldolase OS=Staphylococcu	43683,99	0,382892894	0
Q49ZN1_STAS1	2	Putative transcriptional regulator OS=S	1945,84	Frac_9325	Frac_9325
Q49VP3_STAS1	1	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1009,14	Frac_9325	Frac_9325
Q4A0Y2_STAS1	1	Putative uncharacterized protein OS=Sta	2012,77	0,548811623	0,03
Q49XB9_STAS1	1	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1058,97	Frac_9325	Frac_9325
Q49W44_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	5165,57	Frac_7108	Frac_7108
Q49VC9_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	42439,79	2,534509196	1
Q49ZI5_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	6652,12	Frac_7108	Frac_7108
Q4A0F5_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1333,85	Frac_9325	Frac_9325
Q49YQ1_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	4042,88	0,571209062	0
Q49ZZ3_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	26589,89	1,447734622	1
Q4A067_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3175,2	Frac_9325	Frac_9325
Q49V15_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	7688,73	Frac_7108	Frac_7108
Q49XP1_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	6505,58	0,353454695	0
Q49UZ2_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3939,43	Frac_7108	Frac_7108
Q49VV4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	14878,31	0,818730751	0
Q49VF9_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	19269,98	1,185304853	1
Q49YD5_STAS1	2	Putative universal stress protein OS=St	1388,71	2,293318702	1
Y1056_STAS1	2	Putative universal stress protein SSP105	2427,55	Frac_9325	Frac_9325
PDXS_STAS1	2	Pyridoxal biosynthesis lyase PdxS OS=Stap	3140,64	Frac_9325	Frac_9325
Q49WL9_STAS1	2	Pyruvate dehydrogenase E1 component bet	1201,45	Frac_9325	Frac_9325
Q49VT0_STAS1	2	Ribonucleoside-diphosphate reductase mi	1338,26	Frac_9325	Frac_9325
RRF_STAS1	2	Ribosome-recycling factor OS=Staphylococcu	24793,49	0,458406024	0
Q49X03_STAS1	2	Ribulose-phosphate 3-epimerase OS=Staph	2251,76	Frac_7108	Frac_7108
Q49VK7_STAS1	2	Secretory antigen SsaA-like protein OS=	3007,23	Frac_9325	Frac_9325
GLYA_STAS1	2	Serine hydroxymethyltransferase OS=Staphy	1899,67	Frac_9325	Frac_9325

Q49UQ1_STAS1	2	Single-stranded DNA-binding protein OS=	1894,92	Frac_7108	Frac_7108
Q49Z44_STAS1	2	Single-stranded DNA-binding protein OS=	992,36	Frac_9325	Frac_9325
Q49Z86_STAS1	2	Starvation-inducible DNA-binding protei	37740,23	0,690734327	0
SODM_STAS1	2	Superoxide dismutase [Mn/Fe] OS=Staphyloc	44840,45	0,259240254	0
Q49XD6_STAS1	2	Transketolase OS=Staphylococcus saproph	4262,63	1,682027618	1
TIG_STAS1	2	Trigger factor OS=Staphylococcus saprophyt	2560,58	0,818730751	0
TPIS_STAS1	2	Triosephosphate isomerase OS=Staphylococc	8310,84	1,433329435	1
Y0419_STAS1	2	Uncharacterized oxidoreductase SSP0419 O	2382,17	Frac_7108	Frac_7108
Y1059_STAS1	2	Uncharacterized peptidase SSP1059 OS=Sta	1914,8	0,657046828	0
Y1625_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1625 OS=Staph	2061,75	Frac_7108	Frac_7108
Y1806_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1806 OS=Staph	2378,74	Frac_9325	Frac_9325
Y1134_STAS1	1	UPF0337 protein SSP1134 OS=Staphylococcu	1359,68	Frac_9325	Frac_9325
Y1897_STAS1	2	UPF0337 protein SSP1897 OS=Staphylococcu	3236,93	Frac_7108	Frac_7108
Y954_STAS1	2	UPF0342 protein SSP0954 OS=Staphylococcus	29690,75	0,571209062	0
Y2125_STAS1	2	UPF0447 protein SSP2125 OS=Staphylococcu	3491,31	0,353454695	0
Y1146_STAS1	2	UPF0473 protein SSP1146 OS=Staphylococcu	2529,46	0,618783398	0
URE1_STAS1	2	Urease subunit alpha OS=Staphylococcus sa	2320,21	Frac_7108	Frac_7108
UAFA_STAS1	2	Uro-adherence factor A OS=Staphylococcus	5665,22	Frac_7108	Frac_7108

Tabela S2. Expressão de proteínas de *S. saprophyticus* 9325 em relação à *S. saprophyticus* ATCC 15305.

Accession	OK	Description	Score	Frac_9325:Frac_15305_Ratio	Frac_9325:Frac_15305_P
CH10_STAS1	2	10 kDa chaperonin OS=Staphylococcus sapro	6060,02	0,618783398	0
GPMA_STAS1	2	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phospho	4176,11	0,852143792	0
GPMI_STAS1	2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosp	977,11	Frac_15305	Frac_15305
RS1_STAS1	2	30S ribosomal protein S1 OS=Staphylococcus	1192,02	Frac_15305	Frac_15305
RS10_STAS1	2	30S ribosomal protein S10 OS=Staphylococc	6195,52	0,060810066	0
RS12_STAS1	2	30S ribosomal protein S12 OS=Staphylococc	2981,56	Frac_9325	Frac_9325
RS16_STAS1	2	30S ribosomal protein S16 OS=Staphylococc	2138,73	1,336427477	0,98
RS18_STAS1	2	30S ribosomal protein S18 OS=Staphylococc	2693,94	Frac_9325	Frac_9325
RS5_STAS1	2	30S ribosomal protein S5 OS=Staphylococcus	2236,92	Frac_9325	Frac_9325
RS6_STAS1	2	30S ribosomal protein S6 OS=Staphylococcus	2888,72	Frac_9325	Frac_9325
RS7_STAS1	2	30S ribosomal protein S7 OS=Staphylococcus	2451,75	1,69893226	1
RL19_STAS1	2	50S ribosomal protein L19 OS=Staphylococc	2770,94	Frac_9325	Frac_9325
RL21_STAS1	2	50S ribosomal protein L21 OS=Staphylococc	3600,43	Frac_15305	Frac_15305
RL23_STAS1	2	50S ribosomal protein L23 OS=Staphylococc	3358,77	0,532591804	0
RL25_STAS1	2	50S ribosomal protein L25 OS=Staphylococc	3175,42	0,625002269	0
RL29_STAS1	2	50S ribosomal protein L29 OS=Staphylococc	12005,11	1,061836545	0,96
RL32_STAS1	1	50S ribosomal protein L32 OS=Staphylococc	1049,31	Frac_15305	Frac_15305
RL35_STAS1	2	50S ribosomal protein L35 OS=Staphylococc	6138,39	Frac_15305	Frac_15305
RL5_STAS1	2	50S ribosomal protein L5 OS=Staphylococcus	1653,71	1,433329435	1
RL7_STAS1	2	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Staphyloco	16156,12	0,726149042	0
CH60_STAS1	2	60 kDa chaperonin OS=Staphylococcus sapro	14369,77	0,275270794	0
Q49XV6_STAS1	2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decar	3494,47	0,60653066	0
Q4A0L3_STAS1	1	ABC-type amino acid transport system pe	1040,15	Frac_9325	Frac_9325
Q49ZE7_STAS1	2	Adenylate kinase OS=Staphylococcus sapr	1663,33	0,677056884	0
DHA_STAS1	2	Alanine dehydrogenase OS=Staphylococcus sa	3729,86	Frac_15305	Frac_15305
ASP23_STAS1	2	Alkaline shock protein 23 OS=Staphylococ	2128,81	Frac_9325	Frac_9325
AHPC_STAS1	2	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C O	19851,57	2,293318702	1

Q49WH3_STAS1	2	Bifunctional autolysin OS=Staphylococcus	20205,3	0,71177032	0
CATA_STAS1	2	Catalase OS=Staphylococcus saprophyticus	4213,23	0,600495585	0
Q49WM1_STAS1	2	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Staphylo	5065,51	0,625002269	0
RPOA_STAS1	2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1510,37	Frac_15305	Frac_15305
EFTS_STAS1	2	Elongation factor Ts OS=Staphylococcus sa	8620,21	0,444858065	0
EFTU_STAS1	2	Elongation factor Tu OS=Staphylococcus sa	7278,5	0,65050909	0
ENO_STAS1	2	Enolase OS=Staphylococcus saprophyticus su	9937,23	0,571209062	0
FTN_STAS1	2	Ferritin OS=Staphylococcus saprophyticus s	3310,48	0,778800783	0
HEMH_STAS1	2	Ferrochelatase OS=Staphylococcus saprophy	4272,35	1,349858824	1
Q49Z72_STAS1	2	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Staph	2241,23	0,755783741	0
Q49W97_STAS1	2	Glutamate dehydrogenase OS=Staphylococc	1686,45	Frac_15305	Frac_15305
Q49XA2_STAS1	2	Glutamine synthetase OS=Staphylococcus	1497,09	Frac_15305	Frac_15305
Q4A0H6_STAS1	2	Glutamyl endopeptidase OS=Staphylococcu	5628,53	1,599994191	1
Q49VZ9_STAS1	2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas	11757,89	1,209249595	1
Q4A0W2_STAS1	2	Immunodominant antigen OS=Staphylococcu	6537,75	0,367879441	0
LTAS_STAS1	2	Lipoteichoic acid synthase OS=Staphylococ	10513,36	0,472366553	0
LDH_STAS1	2	L-lactate dehydrogenase OS=Staphylococcus	11750,94	0,718923724	0
Y1834_STAS1	2	NADH dehydrogenase-like protein SSP1834	3427,51	Frac_9325	Frac_9325
NDK_STAS1	2	Nucleoside diphosphate kinase OS=Staphyloc	1342,18	Frac_15305	Frac_15305
OHRL1_STAS1	2	Organic hydroperoxide resistance protein	1312,66	Frac_9325	Frac_9325
PGK_STAS1	2	Phosphoglycerate kinase OS=Staphylococcus	2245,9	0,869358235	0,02
PPAC_STAS1	2	Probable manganese-dependent inorganic py	1866,43	Frac_15305	Frac_15305
QOX2_STAS1	1	Probable quinol oxidase subunit 2 OS=Stap	1108,42	Frac_15305	Frac_15305
TPX_STAS1	2	Probable thiol peroxidase OS=Staphylococcu	3138,2	0,657046828	0
SCED1_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 1 OS=Stap	29300,48	1,87761057	1
SCED2_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 2 OS=Stap	19716,08	1,309964465	1
SCED3_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 3 OS=Stap	29300,48	1,87761057	1
Q49XN3_STAS1	2	PTS system glucose-specific IIA compone	1776,3	Frac_15305	Frac_15305
Q49Z85_STAS1	2	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-ty	1270,91	1,1502738	0,96

Q49WV6_STAS1	2	Putative antibacterial protein OS=Staph	5105,04	Frac_15305	Frac_15305
Q49XP8_STAS1	2	Putative extracellular amidase OS=Staph	1962,78	Frac_15305	Frac_15305
Q49WC9_STAS1	2	Putative oligopeptidase OS=Staphylococc	2565,61	0,93239382	0,04
Q49XC5_STAS1	2	Putative phosphate phosphonate-binding	1019,83	Frac_15305	Frac_15305
Q49ZL8_STAS1	2	Putative secretory antigen OS=Staphyloc	3600,26	3,254374032	1
SP5G_STAS1	2	Putative septation protein spoVG OS=Staph	1899,64	Frac_9325	Frac_9325
Q49YLO_STAS1	2	Putative transaldolase OS=Staphylococcu	14954,31	0,852143792	0
Q49ZN1_STAS1	2	Putative transcriptional regulator OS=S	1945,84	Frac_9325	Frac_9325
Q49W44_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1435,18	Frac_15305	Frac_15305
Q49VP3_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1330,02	0,802518799	0
Q49VC9_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	55643,27	1,363425117	1
Q49X01_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1065,71	Frac_15305	Frac_15305
Q4A0Y2_STAS1	1	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3038,96	0,203925605	0
Q49UH8_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1790,9	Frac_15305	Frac_15305
Q49ZI5_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	2519,04	Frac_15305	Frac_15305
Q4A056_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1319,87	Frac_15305	Frac_15305
Q49XB9_STAS1	1	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1058,97	Frac_9325	Frac_9325
Q4A0F5_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1333,85	Frac_9325	Frac_9325
Q49YQ1_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1462,47	Frac_9325	Frac_9325
Q49ZZ3_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	78320,7	1,094174288	1
Q49ZW4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	4125,14	Frac_15305	Frac_15305
Q4A067_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3175,2	Frac_9325	Frac_9325
Q49XC4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3531,9	Frac_15305	Frac_15305
Q49VV4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	14268,59	0,740818212	0
Q49VF9_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	21150,03	1,233678052	1
Q49YD5_STAS1	2	Putative universal stress protein OS=St	1239,68	0,329558956	0
Y1056_STAS1	2	Putative universal stress protein SSP105	7569,51	0,516851321	0
Q49X11_STAS1	2	Putative zinc metalloprotease OS=Staphy	1487,34	Frac_15305	Frac_15305
PDXS_STAS1	2	Pyridoxal biosynthesis lyase PdxS OS=Stap	1430,01	1,404947596	1

Q49WL9_STAS1	2	Pyruvate dehydrogenase E1 component bet	1008,93	0,852143792	0
Q49VT0_STAS1	2	Ribonucleoside-diphosphate reductase mi	1338,26	Frac_9325	Frac_9325
Q49XG0_STAS1	2	Ribose ABC transporter OS=Staphylococcu	1652,9	Frac_15305	Frac_15305
RRF_STAS1	2	Ribosome-recycling factor OS=Staphylococcu	7648,01	0,810584251	0
Q49VK7_STAS1	2	Secretory antigen SsaA-like protein OS=	2283,4	1,323129814	1
GLYA_STAS1	2	Serine hydroxymethyltransferase OS=Staphy	1899,67	Frac_9325	Frac_9325
Q49Z86_STAS1	2	Starvation-inducible DNA-binding protei	51176,84	0,394553708	0
SODM_STAS1	2	Superoxide dismutase [Mn/Fe] OS=Staphyloc	7340,71	0,771051593	0
Q49XD6_STAS1	2	Transketolase OS=Staphylococcus saproph	7925,42	0,778800783	0
TIG_STAS1	2	Trigger factor OS=Staphylococcus saprophyt	2645,35	0,449328959	0
TPIS_STAS1	2	Triosephosphate isomerase OS=Staphylococc	9327,45	0,904837417	0,01
Y1059_STAS1	2	Uncharacterized peptidase SSP1059 OS=Sta	1199,03	Frac_9325	Frac_9325
Y1625_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1625 OS=Staph	1755,15	Frac_15305	Frac_15305
Y1806_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1806 OS=Staph	1410,69	1,221402762	1
Y1964_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1964 OS=Staph	2414,64	Frac_15305	Frac_15305
Y1134_STAS1	1	UPF0337 protein SSP1134 OS=Staphylococcu	1359,68	Frac_9325	Frac_9325
Y1897_STAS1	0	UPF0337 protein SSP1897 OS=Staphylococcu	1266	Frac_15305	Frac_15305
Y954_STAS1	2	UPF0342 protein SSP0954 OS=Staphylococcus	9823,94	1,476980773	1
Y2125_STAS1	2	UPF0447 protein SSP2125 OS=Staphylococcu	2949,68	0,571209062	0
UREG_STAS1	2	Urease accessory protein UreG OS=Staphylo	1999,7	Frac_15305	Frac_15305
UAFA_STAS1	2	Uro-adherence factor A OS=Staphylococcus	2360,49	Frac_15305	Frac_15305

Tabela S3. Expressão de proteínas de *S. saprophyticus* 7108 em relação à *S. saprophyticus* ATCC 15305.

Accession	OK	Description	Score	Frac_7108:Frac_15305_Ratio	Frac_7108:Frac_15305__P
CH10_STAS1	2	10 kDa chaperonin OS=Staphylococcus sapro	6060,02	7,028687916	1
GPMA_STAS1	2	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phospho	4176,11	4,014849996	1
GPMI_STAS1	2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosph	977,11	31,81697773	1
RS1_STAS1	2	30S ribosomal protein S1 OS=Staphylococcus	1192,02	Frac_15305	Frac_15305
RS10_STAS1	2	30S ribosomal protein S10 OS=Staphylococc	6195,52	0,106458503	0
RS16_STAS1	2	30S ribosomal protein S16 OS=Staphylococc	2138,73	1,616074385	1
RS19_STAS1	2	30S ribosomal protein S19 OS=Staphylococc	10397,65	Frac_7108	Frac_7108
RS6_STAS1	2	30S ribosomal protein S6 OS=Staphylococcus	7906,74	Frac_7108	Frac_7108
RS7_STAS1	2	30S ribosomal protein S7 OS=Staphylococcus	2451,75	Frac_15305	Frac_15305
RS8_STAS1	1	30S ribosomal protein S8 OS=Staphylococcus	1016,98	Frac_15305	Frac_15305
RS9_STAS1	2	30S ribosomal protein S9 OS=Staphylococcus	4012,77	Frac_15305	Frac_15305
HPS2_STAS1	2	3-hexulose-6-phosphate synthase 2 OS=Stap	6462,5	Frac_7108	Frac_7108
RL17_STAS1	2	50S ribosomal protein L17 OS=Staphylococc	1225,88	Frac_7108	Frac_7108
RL20_STAS1	2	50S ribosomal protein L20 OS=Staphylococc	1715,27	Frac_7108	Frac_7108
RL21_STAS1	2	50S ribosomal protein L21 OS=Staphylococc	3600,43	0,60653066	0
RL23_STAS1	2	50S ribosomal protein L23 OS=Staphylococc	3358,77	Frac_15305	Frac_15305
RL24_STAS1	2	50S ribosomal protein L24 OS=Staphylococc	2271,61	Frac_7108	Frac_7108
RL25_STAS1	2	50S ribosomal protein L25 OS=Staphylococc	3175,42	1,69893226	1
RL27_STAS1	2	50S ribosomal protein L27 OS=Staphylococc	3553,65	Frac_7108	Frac_7108
RL29_STAS1	2	50S ribosomal protein L29 OS=Staphylococc	12005,11	2,886370824	1
RL31B_STAS1	2	50S ribosomal protein L31 type B OS=Stap	5368,22	Frac_7108	Frac_7108
RL32_STAS1	1	50S ribosomal protein L32 OS=Staphylococc	1049,31	2,559981412	1
RL35_STAS1	2	50S ribosomal protein L35 OS=Staphylococc	6138,39	2,386910865	1
RL5_STAS1	2	50S ribosomal protein L5 OS=Staphylococcus	1653,71	Frac_15305	Frac_15305
RL7_STAS1	2	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Staphyloco	16156,12	2,363160728	1

RL9_STAS1	2	50S ribosomal protein L9 OS=Staphylococcus	5348,97	Frac_7108	Frac_7108
CH60_STAS1	2	60 kDa chaperonin OS=Staphylococcus sapro	14369,77	0,878095435	0
Q49XV6_STAS1	2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decar	3494,47	2,247907992	1
Q4A0L3_STAS1	2	ABC-type amino acid transport system pe	1916,99	Frac_7108	Frac_7108
Q49ZE7_STAS1	2	Adenylate kinase OS=Staphylococcus sapr	1663,33	3,004166096	1
DHA_STAS1	2	Alanine dehydrogenase OS=Staphylococcus sa	3729,86	Frac_15305	Frac_15305
AHPC_STAS1	2	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C O	19851,57	6,171858774	1
ATPB_STAS1	2	ATP synthase subunit beta OS=Staphylococc	1135,98	2,270499821	1
Q49WH3_STAS1	2	Bifunctional autolysin OS=Staphylococcu	20205,3	0,375311092	0
CATA_STAS1	2	Catalase OS=Staphylococcus saprophyticus	4213,23	1,447734622	1
DNAK_STAS1	2	Chaperone protein DnaK OS=Staphylococcus	6670,95	0,895834136	0
DLTC_STAS1	1	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase su	1581,36	3,596639623	1
Q49WM1_STAS1	2	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Staphylo	5065,51	3,669296493	1
RPOA_STAS1	2	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1510,37	1,521961536	1
EFTS_STAS1	2	Elongation factor Ts OS=Staphylococcus sa	8620,21	2,203396474	1
EFTU_STAS1	2	Elongation factor Tu OS=Staphylococcus sa	7278,5	0,467666431	0
ENO_STAS1	2	Enolase OS=Staphylococcus saprophyticus su	9937,23	0,697676316	0
FTN_STAS1	2	Ferritin OS=Staphylococcus saprophyticus s	3310,48	3,455613498	1
HEMH_STAS1	2	Ferrochelatae OS=Staphylococcus saprophy	4272,35	2,225540955	1
Q49Z72_STAS1	2	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Staph	2241,23	1,363425117	1
Q49XV2_STAS1	2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=	5142,35	Frac_7108	Frac_7108
G6PI_STAS1	2	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Staphylo	5957,48	2,857650982	1
Q49W97_STAS1	2	Glutamate dehydrogenase OS=Staphylococc	1686,45	Frac_15305	Frac_15305
Q49XA2_STAS1	2	Glutamine synthetase OS=Staphylococcus	1497,09	2,829216906	1
Q4A0H6_STAS1	2	Glutamyl endopeptidase OS=Staphylococcu	5628,53	1,616074385	1
Q49VZ9_STAS1	2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas	11757,89	0,506616989	0
CODY_STAS1	2	GTP-sensing transcriptional pleiotropic r	970,86	Frac_15305	Frac_15305
Q49YS4_STAS1	2	Leucyl aminopeptidase OS=Staphylococcus	2553,56	Frac_7108	Frac_7108
Q49W50_STAS1	2	Lipoprotein OS=Staphylococcus saprophyt	2727,01	Frac_7108	Frac_7108

LTAS_STAS1	2	Lipoteichoic acid synthase OS=Staphylococ	10513,36	Frac_15305	Frac_15305
LDH_STAS1	2	L-lactate dehydrogenase OS=Staphylococcus	11750,94	0,307278755	0
Q49YT3_STAS1	2	Methionine aminopeptidase OS=Staphyloco	1207,83	Frac_7108	Frac_7108
SLE1_STAS1	2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sle1 O	1900,48	Frac_15305	Frac_15305
NDK_STAS1	2	Nucleoside diphosphate kinase OS=Staphyloc	1342,18	1,87761057	1
PGK_STAS1	2	Phosphoglycerate kinase OS=Staphylococcus	2245,9	0,771051593	0
RPOE_STAS1	2	Probable DNA-directed RNA polymerase subu	6199,2	Frac_7108	Frac_7108
END4_STAS1	2	Probable endonuclease 4 OS=Staphylococcus	3651,2	Frac_7108	Frac_7108
PPAC_STAS1	2	Probable manganese-dependent inorganic py	1866,43	1,349858824	0,98
QOX2_STAS1	1	Probable quinol oxidase subunit 2 OS=Stap	1108,42	Frac_15305	Frac_15305
Y1389_STAS1	2	Probable tautomerase SSP1389 OS=Staphylo	2268,51	Frac_7108	Frac_7108
TPX_STAS1	2	Probable thiol peroxidase OS=Staphylococcu	3138,2	1,934792385	1
SCED1_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 1 OS=Stap	29300,48	0,449328959	0
SCED2_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 2 OS=Stap	19716,08	0,559898376	0
SCED3_STAS1	2	Probable transglycosylase sceD 3 OS=Stap	29300,48	0,453844786	0
GRPE_STAS1	2	Protein grpE OS=Staphylococcus saprophyti	1339,79	1,433329435	1
Q49XN3_STAS1	2	PTS system glucose-specific IIA compone	1776,3	Frac_15305	Frac_15305
Q49Z85_STAS1	2	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-ty	1270,91	3,35348478	1
Q49YH6_STAS1	2	Putative aminopeptidase OS=Staphylococc	1664,74	Frac_7108	Frac_7108
Q49WV6_STAS1	2	Putative antibacterial protein OS=Staph	5105,04	Frac_15305	Frac_15305
Q49Y87_STAS1	2	Putative cell-shape determining protein	1165,57	Frac_7108	Frac_7108
Q49XP8_STAS1	2	Putative extracellular amidase OS=Staph	1962,78	Frac_15305	Frac_15305
Q49WI6_STAS1	2	Putative flavohemoprotein OS=Staphyloco	2322,45	Frac_15305	Frac_15305
Q49UH9_STAS1	2	Putative mannosyl-glycoprotein endo-bet	4933,57	Frac_15305	Frac_15305
Q49WC9_STAS1	2	Putative oligopeptidase OS=Staphylococc	2565,61	2,664456293	1
Q49XX4_STAS1	2	Putative peptidase OS=Staphylococcus sa	2608,88	Frac_7108	Frac_7108
PPI1_STAS1	2	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomer	2311,29	Frac_7108	Frac_7108
Q49XC5_STAS1	2	Putative phosphate phosphonate-binding	1019,83	Frac_15305	Frac_15305
Q49V17_STAS1	2	Putative RNA binding protein OS=Staphyl	4390	2,585709628	1

Q49ZL8_STAS1	2	Putative secretory antigen OS=Staphyloc	3600,26	Frac_15305	Frac_15305
Q49ZX5_STAS1	2	Putative small heat shock protein OS=St	1918,15	Frac_7108	Frac_7108
Q49YH5_STAS1	2	Putative thioredoxin OS=Staphylococcus	1969,52	1,934792385	1
Q49YL0_STAS1	2	Putative transaldolase OS=Staphylococcu	14954,31	2,181472203	1
Q49WH6_STAS1	2	Putative transcriptional regulator OS=S	2929,43	0,360594947	0
Q4A0Y2_STAS1	1	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3038,96	1,768267039	1
Q49W44_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1435,18	3,2219925	1
Q49VP3_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1330,02	Frac_15305	Frac_15305
Q49VC9_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	55643,27	0,543350861	0
Q49X01_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1065,71	Frac_15305	Frac_15305
Q49UH8_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1790,9	Frac_15305	Frac_15305
Q49ZI5_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	2519,04	2,915379653	1
Q4A056_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	1319,87	Frac_15305	Frac_15305
Q49YQ1_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	4042,88	Frac_7108	Frac_7108
Q49ZZ3_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	78320,7	0,869358235	0
Q49ZW4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	4125,14	Frac_15305	Frac_15305
Q49V15_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	7688,73	Frac_7108	Frac_7108
Q49XC4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	3531,9	Frac_15305	Frac_15305
Q49VV4_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	14268,59	2,054433269	1
Q49VF9_STAS1	2	Putative uncharacterized protein OS=Sta	21150,03	0,718923724	0
Q49YD5_STAS1	2	Putative universal stress protein OS=St	1239,68	8,414867774	1
Y1056_STAS1	2	Putative universal stress protein SSP105	7569,51	Frac_15305	Frac_15305
Q49X11_STAS1	2	Putative zinc metalloprotease OS=Staphy	1487,34	Frac_15305	Frac_15305
PDXS_STAS1	2	Pyridoxal biosynthesis lyase PdxS OS=Stap	1430,01	Frac_15305	Frac_15305
Q49WL9_STAS1	2	Pyruvate dehydrogenase E1 component bet	1008,93	Frac_15305	Frac_15305
Q49XG0_STAS1	2	Ribose ABC transporter OS=Staphylococcu	1652,9	Frac_15305	Frac_15305
RRF_STAS1	2	Ribosome-recycling factor OS=Staphylococcu	7648,01	2,886370824	1
Q49X03_STAS1	2	Ribulose-phosphate 3-epimerase OS=Staph	2251,76	Frac_7108	Frac_7108
Q49VK7_STAS1	2	Secretory antigen SsaA-like protein OS=	2283,4	Frac_15305	Frac_15305

ALBU_BOVIN	2	SERUM ALBUMIN PRECURSOR	3739,4	0,663650253	0
Q49UQ1_STAS1	2	Single-stranded DNA-binding protein OS=	1894,92	Frac_7108	Frac_7108
Q49Z86_STAS1	2	Starvation-inducible DNA-binding protei	51176,84	1,840431425	1
SODM_STAS1	2	Superoxide dismutase [Mn/Fe] OS=Staphyloc	7340,71	5,002811299	1
GREA_STAS1	2	Transcription elongation factor GreA OS=S	3929,46	Frac_7108	Frac_7108
Q49XD6_STAS1	2	Transketolase OS=Staphylococcus saproph	7925,42	0,670320042	0
TIG_STAS1	2	Trigger factor OS=Staphylococcus saprophyt	2645,35	1,803988368	1
TPIS_STAS1	2	Triosephosphate isomerase OS=Staphylococc	9327,45	1,11627807	0,98
Y0419_STAS1	2	Uncharacterized oxidoreductase SSP0419 O	2382,17	Frac_7108	Frac_7108
Y1059_STAS1	2	Uncharacterized peptidase SSP1059 OS=Sta	1914,8	Frac_7108	Frac_7108
Y1625_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1625 OS=Staph	1755,15	2,611696417	1
Y1806_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1806 OS=Staph	1410,69	Frac_15305	Frac_15305
Y1964_STAS1	2	Uncharacterized protein SSP1964 OS=Staph	2414,64	Frac_15305	Frac_15305
Y954_STAS1	2	UPF0342 protein SSP0954 OS=Staphylococcus	9823,94	4,526730751	1
Y2125_STAS1	2	UPF0447 protein SSP2125 OS=Staphylococcu	2949,68	2,435129616	1
URE3_STAS1	2	Urease subunit gamma OS=Staphylococcus sa	3607,82	2,363160728	1
UAFA_STAS1	2	Uro-adherence factor A OS=Staphylococcus	2360,49	3,560852494	1
