

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

GUILHERME ALGUSTO ALVES SILVA

CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO PROTEICO SsaA DE *Staphylococcus saprophyticus* UTILIZANDO ESTRATÉGIAS *in silico* E MODELO *ex vivo* DE INFECÇÃO

Goiânia 2020

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

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

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

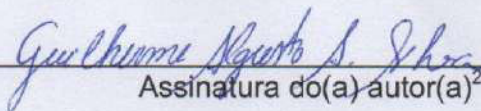
Nome completo do autor: Guilherme Augusto Alves Silva

Título do trabalho: CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO PROTEICO SsaA DE *Staphylococcus saprophyticus* UTILIZANDO ESTRATÉGIAS *in silico* E MODELO *ex vivo* DE INFECÇÃO

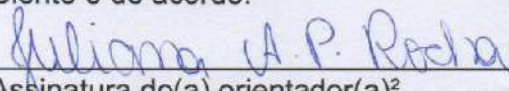
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 15/04/2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

GUILHERME ALGUSTO ALVES SILVA

CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO PROTEICO SsaA DE *Staphylococcus saprophyticus* UTILIZANDO ESTRATÉGIAS *in silico* E MODELO *ex vivo* DE INFECCÃO

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás para avaliação de Defesa e obtenção do título de Mestre em genética e biologia molecular.

Linha de Pesquisa: Genômica funcional, estrutural e proteômica

Orientadora: Professora Dr^a Juliana Alves Parente Rocha

Goiânia 2020

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

Silva, Guilherme Augusto Alves
CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO PROTEICO SsaA DE
Staphylococcus saprophyticus UTILIZANDO ESTRATÉGIAS in silico E
MODELO ex vivo DE INFECÇÃO [manuscrito] / Guilherme Augusto
Alves Silva. - 2020.
v, 39 f.: il.

Orientador: Profa. 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, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras.

1. Staphylococcus saprophyticus. 2. Proteína SsaA. 3. Proteínas
imunogênicas. I. Rocha, Juliana Alves Parente, orient. II. Título.

CDU 577.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **79** da sessão de Defesa de Dissertação de **Guilherme Augusto Alves Silva**, que confere o título de Mestre(a) em **Genética e Biologia Molecular**, na área de concentração em **Genômica funcional, estrutural e proteômica**.

Ao/s **dois dias do mês de março**, a partir da(s) **14:00 horas**, no(a) **Auditório do Instituto de Ciências Biológicas IV**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO PROTEICO SsaA DE *Staphylococcus saprophyticus* UTILIZANDO ESTRATÉGIAS *in silico* E MODELO *ex vivo* DE INFECÇÃO**”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Juliana Alves Parente Rocha (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutor(a) **Mariana Vieira Tomazett (ICB/UFG)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **André Correa Amaral (IPTSP/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não** sugeriram alteração de título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Juliana Alves Parente Rocha**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **dois dias do mês de março de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Alves Parente Rocha, Professora do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Vieira Tomazett, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1193393** e o código CRC **B22FECE4**.

Referência: Processo nº 23070.005674/2020-24

SEI nº 1193393

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Dr^a Juliana Alves Parente Rocha

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

Dr^a Mariana Vieira Tomazett

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

Dr. André Corrêa Amaral

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

Membro suplente:

Dr^a Vanessa Rafaela Milhomem Cruz Leite

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

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1.0 INTRODUÇÃO	13
1.1- Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i> e da espécie <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	13
1.2- Relevância clínica de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	17
1.3- Proteínas imunogênicas/proteínas secretadas.....	19
1.4- Antígeno Estafilocócico Secretado A (<i>SsaA</i>)	20
1.5- Enzima Amidase	22
2.0 JUSTIFICATIVA	23
3.0 OBJETIVOS	25
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1- Caracterização da proteína <i>SsaA in silico</i>	26
4.2- Avaliação da relevância da secreção de <i>SsaA</i> durante a interação com macrófagos murinos J774 1.6	26
4.3- Análise estatística.....	28
4.4- Autoindução da proteína <i>SsaA</i> através de expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> e purificação de <i>SsaA</i> recombinante	28
4.5- Solubilização e purificação da proteína <i>SsaA</i>	29
5. RESULTADOS	31
5.1- Análises <i>in silico</i> da proteína <i>SsaA</i>	31
5.2- Ensaio de fagocitose.....	34
5.3- Autoindução, solubilização e purificação da proteína <i>SsaA</i>	35
6.0 DISCUSSÃO	38

7.0 CONCLUSÃO.....	41
8.0 PERSPECTIVAS.....	42
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
10. Anexos.....	49
10.1- Apresentação em Congresso	49
10.2- Produção científica	50
10.3- Atividade de extensão.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

μ l - Microlitro

μ g/mL – Micrograma por Mililitro

Aas – do inglês, *Autolysin / adhesin protein* (proteína autolisina/adesina)

ATCC – do inglês, *American Type Culture Collection* (coleção de cultura americana)

AtlE – do inglês, *Staphylococcus epidermidis autolysin* (autolisina de *Staphylococcus epidermidis*)

BHI – do inglês, *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração)

CHAP – do inglês, *Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolases/Peptidases* (cisteína, amido-hidrolases / peptidases dependentes de histidina)

D.O – Densidade Óptica

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EcoRI – Enzima de restrição isolada de *Escherichia coli*

g – Gramas

GST - Glutathione-S-Transferase

IgG – Imunoglobulinas G

IsaA – do inglês, *Immunodominant Staphylococcal Antigen A* (antígeno imunodominante A)

ITU – Infecção do Trato Urinário

kDa – Kilodalton

LB – Luria Bertani

LytH – Provável amidase da parede celular de *Staphylococcus aureus*

m/v – Massa/Volume

mL – Mililitros

MLSB – do inglês, *Macrolides antibiotics, lincosamides and streptogramin B* (antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B)

mM – Milimolar

MSCRAMMS – do inglês, *Components of the microbial surface that recognize adhesive matrix molecules* (componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva)

MurNAc-LAAs – N-acetilmuramoil-L-alanina amidase

°C – Grau Celsius

PBS – do inglês, *Phosphate-buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PDB - do inglês, *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteínas)

pH – Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

SceB – do inglês, *Signaled peptide-dependent transported protein* (proteína transportada dependente de peptídeo sinalizada)

SCN - Estafilococos Coagulase Negativa

SCP - Estafilococos Coagulase Positiva

SdrI – do inglês, *Serina-Aspartate Repeat Protein* (proteína de repetição de repetição de serina-aspartato)

SDS-PAGE – do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfatodesódio)

SsaA - do inglês, *Staphylococcal secreted antigen A* (antígeno estafilocócico secretado A)

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

TCS – do inglês, *Two-component regulatory transcription systems* (sistemas reguladores de transcrição de dois componentes)

TGU – Trato Geniturinário

U/mL – Unidade por mililitro

UafA – do inglês, *Uroaderence factor A* (fator de uroaderência A)

UafB – do inglês, *Uroaderence factor B* (fator de uroaderência B)

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

v/v – Volume/Volume

XhoI – Enzima de restrição isolada de *Xanthomonas holcicola*

YycG/YycF – do inglês, *Two-component regulatory system composed of histidine kinase (YycG) and a transcriptional regulator (YycF)* (sistema regulatório de dois componentes composto por uma histidina quinase (YycG) e um regulador transcricional (YycF))

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MVE) de *Staphylococcus saprophyticus* - *Science Photo Library* (<https://www.sciencephoto.com/media/12902/>)-----13
- Figura 2.** Resultado da predição do peptídeo sinal da proteína *SsaA* usando o servidor SignalP -5.0. No eixo horizontal está representado os aminoácidos constituintes da proteína e no eixo vertical a estimativa da probabilidade de ocorrência do peptídeo sinal. SP: peptídeo sinal Sec/SPI; TAT: peptídeo sinal da proteína TAT; LIPO: peptídeo sinal da lipoproteína Sec/SPII-----31
- Figura 3.** Modelo gerado pelo servidor I-TASSER para a proteína *SsaA* de *S. saprophyticus*. Valor de *C-score* = -1.14.-----32
- Figura 4.** Modelo predito para a proteína *SsaA* através do programa PyMOL versão 1.3. Na figura **A** em vermelho foi destacado a região correspondente ao domínio CHAP da proteína *SsaA*. Na figura **B** os epítomos preditos na sequência da proteína *SsaA* foram destacados em azul-----33
- Figura 5.** Avaliação do índice de fagocitose após o tratamento com anticorpo *SsaA*. **1** - *S. saprophyticus*; **2** - Células de *S. saprophyticus* tratadas com soro pré-imune e **3** – Células de *S. saprophyticus* na presença de anti-*SsaA*. * = $p \leq 0,05$. O experimento de fagocitose foi realizado em triplicata.-----35
- Figura 6.** Gel unidimensional de poliacrilamida mostrando a indução e a solubilização da proteína *SsaA*. **1** - Ponto zero, sem indução; **2** – autoindução da proteína *SsaA* e **3** – Sobrenadante da solubilização; A seta indica a posição da banda correspondente a proteína *SsaA* (tamanho de aproximadamente 51kDa).-----36
- Figura 7.** SDS-PAGE mostrando a solubilização da proteína *SsaA* e a ligação da proteína à resina de sefarose. **1** – Solubilização do sobrenadante da indução de *SsaA*; **2** – Resina de sefarose contendo a proteína *SsaA*. A seta indica a posição da banda correspondente a proteína *SsaA*.-37

RESUMO

Staphylococcus saprophyticus é uma bactéria Gram-positiva e se destaca como o segundo patógeno responsável por casos diagnosticados de infecção do trato urinário (ITU), afetando principalmente mulheres jovens. Alguns fatores podem explicar a capacidade do *S. saprophyticus* de colonizar regiões periuretrais, urinárias e genitais, como a capacidade de se ligar ao tecido epitelial do trato geniturinário e a alta atividade da enzima urease. No entanto, poucos mecanismos que esta bactéria utiliza para infectar e colonizar eficientemente o hospedeiro são totalmente elucidados. Em espécies do gênero *Staphylococcus*, a maioria dos fatores de virulência conhecidos tratam-se de proteínas ou de superfície do patógeno. Nosso grupo de pesquisa identificou proteínas secretadas de isolados de *S. saprophyticus* que demonstraram uma forte capacidade de estimular a resposta imune em camundongos e uma das principais proteínas imunogênicas identificadas foi o Antígeno Estafilocócico Secretado A (*SsaA*), ainda não caracterizado nesta espécie. Em outras espécies do gênero *Staphylococcus*, a proteína *SsaA* parece estar relacionada a fatores de virulência regulados pelos mesmos sistemas, porém seu papel específico durante a infecção ainda não foi totalmente elucidado. Neste sentido, propomos a caracterização da proteína *SsaA* em *S. saprophyticus*. Análises de bioinformática usando o banco de dados revelaram que a proteína *SsaA* possui um domínio CHAP com uma função amidase prevista. A estrutura 3D da proteína *SsaA* foi prevista através da modelagem de proteínas usando servidor online seguindo os protocolos de validação, foi usado o servidor ABCpred para prever epítomos na sequência da proteína *SsaA*. A análise do ensaio de fagocitose revelou que o bloqueio da proteína *SsaA* por soros contendo anticorpo anti-*SsaA* reduz o número de células recuperadas indicando assim que *SsaA* pode ser importante durante o processo infeccioso. Nosso trabalho contribuirá para elucidar a função biológica da proteína *SsaA*, uma proteína imunogênica que pode ser útil como alvo de diagnóstico e / ou vacina neste modelo.

Palavras-chave: *Staphylococcus saprophyticus*; proteína *SsaA*; proteínas imunogênicas

ABSTRACT

Staphylococcus saprophyticus is a Gram-positive bacterium and stands out as the second pathogen responsible for diagnosed cases of urinary tract infection (UTI), affecting mainly young women. Some factors may explain the ability of *S. saprophyticus* to colonize periurethral, urinary and genital regions, such as the ability to bind to the epithelial tissue of the genitourinary tract and the high activity of the urease enzyme. However, few mechanisms that this bacterium uses to efficiently infect and colonize the host are fully elucidated. In species of the *Staphylococcus* genus, most of the known virulence factors are proteins or the pathogen's surface. Our research group identified proteins secreted from *S. saprophyticus* isolates that demonstrated a strong ability to stimulate the immune response in mice and one of the main immunogenic proteins identified was the Staphylococcal Antigen Secreted A (*SsaA*), not yet characterized in this species. In other species of the *Staphylococcus* genus, the *SsaA* protein seems to be related to virulence factors regulated by the same systems, but its specific role during infection has not yet been fully elucidated. In this sense, we propose the characterization of the *SsaA* protein in *S. saprophyticus*. Bioinformatics analyzes using the database revealed that the *SsaA* protein has a CHAP domain with an expected amidase function. The 3D structure of the *SsaA* protein was predicted through the modeling of proteins using an online server following the validation protocols, the ABCpred server was used to predict epitopes in the *SsaA* protein. Analysis of the phagocytosis assay revealed that blocking the *SsaA* protein by sera containing anti-*SsaA* antibody reduces the number of cells recovered thus indicating that *SsaA* may be important during the infectious process. Our work will contribute to elucidate the biological function of the *SsaA* protein, an immunogenic protein that can be useful as a diagnostic target and / or vaccine in this model.

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*; *SsaA* protein; immunogenic proteins

1.0 INTRODUÇÃO

1.1- Características gerais do gênero *Staphylococcus* e da espécie *Staphylococcus saprophyticus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído por um grupo de bactérias Gram-positivas que em algumas circunstâncias podem se tornar patogênicas. As bactérias desse grupo são encontradas em habitats variados como, por exemplo, na microbiota humana e no meio ambiente (MURRAY et al., 2009; COTON et al., 2010; SOUSA et al., 2017). Os organismos desse gênero possuem características que as diferem das demais bactérias apresentando formato esférico com tendência a se aglomerar, ausência de mobilidade, são organismos anaeróbios facultativos e podem ser identificadas por meio de suas características externas como parede celular - formada por ácido teicóico e peptidoglicanos - e morfologia da colônia - apresentam forma convexa e coloração amarelo-alaranjado ou branco-porcelana. Entretanto, para a identificação definitiva recomenda-se o uso de dados moleculares que permitem a identificação por meio de comparação das sequências de RNA ribossomais 16S. As colônias formadas por bactérias desse gênero demonstram capacidade de crescimento rápido e geralmente exibem tamanho de aproximadamente 1,0 a 2,0 mm de diâmetro (MURRAY et al., 2009; LAMERS et al., 2012; ANVISA 2018). Na figura 1 é possível observar uma microscopia eletrônica de varredura evidenciando células de *Staphylococcus saprophyticus*.



Figura 1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MVE) de *Staphylococcus saprophyticus* - *Science Photo Library* (<https://www.sciencephoto.com/media/12902/>).

Como citado anteriormente, os microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* têm capacidades de persistir em vários habitats, frequentemente fazem parte da microbiota humana, colonizando a epiderme, vias respiratórias, trato gastrointestinal e geniturinário. Algumas espécies podem ser encontradas em alimentos como, por exemplo, derivados do leite e carnes, também podem ser isoladas de ambientes marinhos, águas poluídas e locais relacionados a recreação aquática (SOUSA et al., 2017). A constatação de isolados de bactérias desse gênero de diferentes fontes pode indicar que esses microrganismos apresentam uma plasticidade das respostas ao meio em que estão colonizando permitindo assim sua sobrevivência (COTON et al., 2010; BASSO et al., 2014;).

O gênero *Staphylococcus* é classificado em dois grupos com base na produção da enzima coagulase (FAIRBROTHER, 1940). Essa enzima tem a função de coagular o plasma, classificando o grupo que produz a enzima coagulase como estafilococos coagulase positivos (SCP) nesse grupo está incluído a espécie *Staphylococcus aureus*, enquanto o grupo estafilococos coagulase negativa (SCN) não apresenta a produção dessa enzima e inclui algumas espécies do gênero como por exemplo, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. A classificação das bactérias desse gênero com base na atividade enzimática da coagulase é uma alternativa que exige poucos custos para ser realizada, gerando resultados rápidos e práticos para identificação de qual grupo cada espécie bacteriana pertence (MURRAY et al., 2009; OTTO et al., 2009).

As bactérias desse gênero podem causar infecções graves quando não tratadas de forma eficiente e podem apresentar resistência a antibióticos que são normalmente utilizados para o tratamento de outras infecções. Entre as bactérias desse grupo, destacam-se três espécies que estão mais relacionadas aos quadros clínicos diagnosticados, são elas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* (FARIÑA et al., 2013). Para estabelecer as etapas iniciais da infecção e a posterior colonização, essas bactérias apresentam mecanismos que possibilitam sua permanência no hospedeiro. Tais mecanismos estão associados as suas habilidades de resistir e/ou evadir do sistema imunológico do organismo hospedeiro (ABBY et al., 2016). As bactérias estafilocócicas são capazes de evitar a fagocitose pelo processo de opsonização, sintetizar proteínas que desempenham funções em ambiente extracelular, produzir proteínas de superfície e, em alguns casos, proteínas que estimulam uma resposta intensa do sistema imunológico do hospedeiro (FAIRBROTHER, 1940; MURRAY et al., 2009).

No gênero *Staphylococcus*, a única espécie descrita como uropatogênica, até o presente momento, é *S. saprophyticus*. Alguns fatores podem explicar essa habilidade de colonizar regiões periuretral, vias urinárias e genitais como, por exemplo a sua capacidade de aderência ao tecido epitelial do trato geniturinário e pela alta atividade da enzima urease (GATERMANN & MARRE, 1989). Essa enzima tem a função de converter a ureia em amônia e dióxido de carbono estimulando a alcalinização do meio onde esse patógeno está presente. Considera-se que essa alteração de pH facilite a sobrevivência bacteriana em ambientes específicos no hospedeiro (GATERMANN & MARRE, 1989). Além da urease, há também proteínas de superfície que foram identificadas e caracterizadas que auxiliam no processo de colonização e permanência no hospedeiro como, por exemplo, a proteína de repetição de serina-aspartato de ligação ao colágeno (*Sdrl*), fator de uroaderência (*UafA*), autolisina de ligação à fibronectina (*Aas*) e uma lipase (*Ssp*) associada a superfície (KURODA et al., 2005; SAKINC et al., 2006; SZABADOS et al., 2013).

A lipase associada à superfície de *S. saprophyticus* (*Ssp*) é uma adesina abundante de superfície. Sakinc e colaboradores, em 2006, caracterizaram *Ssp* como uma proteína que apresenta atividade de lipase. Enquanto a autolisina de *S. saprophyticus* (*Aas*) é uma proteína que demonstra várias funções como, ligação a fibronectina e pode atuar como uma autolisina, promovendo remodelamento de parede celular durante crescimento bacteriano (KURODA et al., 2005; SAKINC et al., 2006). Outra adesina caracterizada nessa espécie é a proteína de uroaderência A (*UafA*) que favorece a proliferação do tecido epitelial do trato urinário. Essa proteína é descrita por ser ancorada a parede celular e possuir uma região denominada de A, daí a nomenclatura dessa proteína. Existe ainda outro fator de uro-aderência conhecido como *UafB*, que apresenta uma alta afinidade por fibrinogênio e fibronectina (KURODA et al., 2005; KING et al., 2011).

As proteínas de superfície presentes em *S. saprophyticus* são consideradas como possíveis fatores de virulência, uma vez que são cruciais para a colonização, elas apresentam a capacidade de se aderir a proteínas da matriz extracelular ou de forma direta as células do trato urinário (SAKINC et al., 2006). Considerando-se que a fixação de fato desempenha importante papel durante a colonização e estabelecimento dessas bactérias patogênicas, proteínas de aderência são fortes candidatas à importantes fatores de virulência (KLEINE et al., 2015).

Em 2010 um estudo sobre a variação genotípica e fenotípica de *S. saprophyticus* provenientes de humanos e animais, realizado por Kleine e colaboradores, foi demonstrado que apesar das cepas de *S. saprophyticus* de origem animal possuírem fatores para a colonização do

trato urinário, como a D-serina-deaminase, os resultados indicaram que para esse microrganismo consiga de fato obter sucesso na colonização dos hospedeiros eles precisam adquirir novos genes como, por exemplo, MSCRAMMS (componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva) para desenvolverem uma capacidade mais refinada de aderência como *SdrI* e para regular suas propriedades intrínsecas como o aumento da atividade da lipase (KLEINE et al., 2010).

A espécie *S. saprophyticus* tem uma capacidade de persistir às adversidades do meio ambiente apresentando uma grande plasticidade que lhe permite propagar por diferentes habitats. Como relatado em outras espécies bacterianas, *S. saprophyticus* pode transferir resistências através de elementos gênicos que transportam genes de resistência. Em 2017 Sousa e colaboradores constataram a presença de genes de resistência a eritromicina C, *msrA*, *msrB*, *mphC* e *linA* em 93% das cepas analisadas. Eles analisaram cepas isoladas de várias fontes como, por exemplo, alimentos, microbiota de grávidas sem infecção de TGU e amostras de águas recuperadas de praias. Estes resultados sugerem alta capacidade de adaptação e persistência sob várias condições abióticas, o que pode facilitar a transferência de genes e plasmídeos para outras espécies (SOUSA et al., 2017).

A capacidade de formação de biofilmes também foi observada em *S. saprophyticus*, assim como em *S. epidermidis*. Algumas proteínas denominadas autolisinas como *Aas* presentes em *S. saprophyticus* e *AtIE* em *S. epidermidis* são essenciais durante a formação de biofilme devido a suas propriedades de remodelar peptídeoglicanos (KNOBLOCH et al., 2001; BECKER et al., 2014). No gênero *Staphylococcus* a produção de biofilmes é comum entre as espécies identificadas, a síntese de biofilme pode influenciar a ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro como, por exemplo, dificultando a fagocitose por opsonização, impedindo a ação de proteínas do sistema imune e favorecer a adesão e infecção de células epiteliais (KO et al., 2013).

A relação entre patógeno e hospedeiro de fato é complexa, principalmente considerando o gênero *Staphylococcus*. Algumas espécies desse gênero, principalmente as classificadas como coagulase negativas, podem ser comensais da microbiota humana ou em determinadas circunstâncias - quando há alteração do ténue equilíbrio da microbiota - elas podem se tornar patogênicas, e em alguns casos ocasionando danos severos ao hospedeiro. As bactérias pertencentes desse gênero apresentam vários mecanismos adaptativos para obterem sucesso na sua colonização e disseminação (MURRAY et al., 2009; COTON et al., 2010; SOUZA et al., 2017).

1.2- Relevância clínica de *Staphylococcus saprophyticus*

As bactérias da espécie *S. saprophyticus* são consideradas a segunda maior causa de infecção do trato geniturinário em mulheres jovens, perdendo apenas para *Escherichia coli* que pode acometer pessoas saudáveis e fora do ambiente hospitalar (BECKER et al., 2014). *Staphylococcus saprophyticus* está incluído no grupo Estafilococos Coagulase negativa (SCN) e, como citado anteriormente, destaca-se como o segundo patógeno responsável pelos casos diagnosticados de infecção do trato urinário (ITU) em pacientes de faixa etária jovem, acometendo principalmente mulheres (RUPP et al., 1992; RAZ et al., 2005). A infecção causada por *S. saprophyticus* apresenta sintomas similares aos sintomas causados por *E. coli* e na maioria dos casos é necessário o exame de cultura para a confirmação. Cada vez mais torna-se evidente estudos acerca de *S. saprophyticus* considerando que seja um dos principais patógenos humanos relacionados a infecção do trato urinário, estima-se que é o agente causador de até 40% das infecções urinárias em pacientes do gênero feminino (HOOTON & STAMM, 1997; FERREIRA et al., 2012).

Os hospedeiros humanos podem adquirir esse microrganismo pelo contato direto com animais contaminados ou ainda com a ingestão de alimentos de origem animal inadequadamente cozidos. Mulheres jovens (13 a 40 anos) são mais suscetíveis à colonização geniturinária por *S. saprophyticus* do que as mulheres pertencentes as outras faixas etárias, acima dos 40 anos (GUIDONI, 2001). Algumas mulheres podem desenvolver ITU associadas a variações hormonais que ocorrem no início ou ao longo do período menstrual. A relação sexual pode propiciar a colonização e infecção dessa bactéria. Mudanças na microbiota genital por cândida ou espermicidas, facilitam a colonização por *S. saprophyticus* (RAZ et al., 2005).

A infecção do trato urinário causada por bactérias é um distúrbio considerado comum, que pode ocorrer em praticamente todas as idades. Durante a adolescência e a fase adulta pessoas do sexo feminino estão mais propensas a desenvolver ITU, são mais susceptíveis em uma proporção de aproximadamente 10 a 20 vezes mais do que em pessoas do sexo masculino. Constata-se que em determinados períodos da vida da paciente pode ser mais comum o desenvolvimento da infecção do trato urinário como, por exemplo, gestação, atividade sexual e o período de menopausa, aproximadamente 48% das mulheres apresentam pelo menos um caso de infecção do trato urinário ao longo da vida (FOXMAN, 2002).

A maior incidência de ITU em mulheres, principalmente na faixa etária jovem, pode ser explicada pelas mudanças hormonais que ocorrem naturalmente na fase reprodutiva (RAZ et

al., 2005). Além disso, há outros fatores determinantes para a susceptibilidade da mulher à infecção do trato urinário como, por exemplo, o tamanho reduzido da uretra e a maior proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. Já no homem, o maior comprimento da uretra e o fator antimicrobiano prostáticos são aspectos que podem esclarecer a menor incidência de ITU no sexo masculino (HEILBERG & SCHOR, 2003).

As bactérias da espécie *S. saprophyticus* são consideradas como importantes patógenos relacionados aos casos de ITU não complicada, ou seja, quando causam infecção do trato urinário em pacientes que não apresentam danos na estrutura ou comprometimento da função dos tecidos e órgãos do trato urinário (GLIMAKER et al., 1988). *S. saprophyticus* tem resistência cromossomal ao antibiótico novobiocina por apresentar diferença nucleotídica no gene que codifica DNA girase (alvo deste antibiótico). A resistência à novobiocina é utilizada para diferenciar *S. saprophyticus* de outras espécies coagulase negativas (BECKER et al., 2014). E quando não há o tratamento correto da infecção por *S. saprophyticus*, a infecção passa para os estágios mais graves e observa-se o desenvolvimento de septicemia, nefrolitíase, pielonefrite e endocardite (SINGH & RAAD, 1990; HEDMAN & RINGERTZ, 1991).

Os sintomas provocados pela infecção por *S. saprophyticus* são similares aos sintomas de outras bactérias que causam ITU, porém em alguns pacientes acometidos por *S. saprophyticus* pode ser observado com maior frequência hematúria e piúria. Além desses sintomas, os pacientes acometidos por essa bactéria também podem apresentar dores nas costas, disúria e frequência urinária aumentada. *S. saprophyticus* é responsável por 13% das infecções do trato urinário superior dos casos diagnosticados, uma incidência considerada muito maior do que a relatada para outras bactérias relacionadas a infecção do trato urinário (JELLHEDEN et al., 1996).

O tratamento de pacientes acometidos pela infecção causada por *S. saprophyticus* pode ser feito com antibióticos comumente usados para o combate de infecções do trato urinário causadas por outras bactérias (ORDEN-MARTÍNEZ & MARTÍNEZ-RUIZ, 2008), exceto o uso de ácido nalidíxico (substância ativa que é indicada para o tratamento de infecções urinárias e intestinais causadas por bactérias Gram-negativas) e o do uso do antibiótico fosfomicina, pois *S. saprophyticus* possui resistência a esse antibiótico (WALLMARK et al., 1978; KAHLMETER, 2003).

1.3- Proteínas imunogênicas/proteínas secretadas

Para que ocorra a infecção os microrganismos patogênicos possuem algumas estratégias para evadir-se do sistema imunológico ou resistir a resposta imune do hospedeiro. As bactérias secretam um conjunto de proteínas que são essenciais para a permanência do patógeno no hospedeiro. Tais proteínas podem auxiliar na proteção contra estresse oxidativo e ainda podem causar uma resposta acentuada do sistema imunológico do hospedeiro estimulando células fagocíticas durante o processo infeccioso (LEE & SCHNEEWIND, 2001). Esta estimulação pode aumentar a taxa de fagocitose e o patógeno pode persistir dentro de células do hospedeiro como forma de evadir-se de moléculas tóxicas secretadas por células de defesa. Este fato demonstra a complexidade da relação entre patógeno-hospedeiro (ABBY et al., 2016).

As proteínas secretadas representam um fator importante para a infecção causada por bactérias. Como uma forma de evidenciar ainda mais a importância de tais proteínas podemos citar como exemplo a espécie mais estudada do gênero, *S. aureus*. Em *S. aureus* a maioria dos fatores de virulência estudados e caracterizados são proteínas secretadas que podem tanto ser adesinas, quanto enzimas exportadas para o meio extracelular que facilitam a permanência do patógeno, auxiliando na capacidade dessas bactérias de evadir do sistema imunológico do hospedeiro (KUSCH & ENGELMANN, 2014). Ainda em estudos de *S. aureus*, foram observados a produção de superantígenos secretados que causam graves sintomas da Síndrome do Choque Tóxico, conhecida também como TSS (SCHLIEVERT et al., 2014).

Como constatado, a maioria dos fatores de virulência estudados nas bactérias desse gênero são proteínas secretadas durante o processo de infecção. Estas proteínas podem estar associadas diretamente a outras estratégias que facilitam a disseminação e permanência no hospedeiro, tais como: produção de proteínas de aderência, formação de cápsula polissacarídica e formação de biofilmes. Essas características são essenciais para a ligação da célula patogênica ao tecido do hospedeiro e proteção contra o reconhecimento do sistema imune ou proteção contra substâncias antimicrobiana como no caso da formação de biofilmes - células patogênicas no interior da estrutura do biofilme estão protegidas do contato de antibióticos (FARIÑA et al., 2013).

Estudos a respeito dos mecanismos de adaptação as condições do hospedeiro por microrganismos do gênero *Staphylococcus* estão concentrados nas espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*. No entanto, ainda são poucos os estudos que elucidam os mecanismos de adaptação de *S. saprophyticus* assim como prováveis fatores de virulências e proteínas

antigênicas. Estas últimas são capazes de deflagrar o sistema imunológico do hospedeiro e podem ser relevantes para a compreensão das estratégias utilizadas pelo patógeno na interação patógeno-hospedeiro (KLEINE et al., 2010).

1.4- Antígeno Estafilocócico Secretado A (*SsaA*)

A proteína *SsaA*, por estar presente na maioria das espécies do gênero *Staphylococcus*, foi foco de alguns estudos com mutantes que tinham como objetivo tentar compreender quais os possíveis mecanismos de sua regulação. Os resultados de tais estudos sugeriram que a proteína *SsaA* pode ser regulada por sistemas, já descritos como o YycG/YycF, que também regulam determinados fatores de virulência em outras espécies do gênero como, por exemplo, *S. aureus* (DUBRAC & MSADEK, 2004; STAPLETON et al., 2007).

Em geral a expressão de genes que codificam para proteínas que são consideradas fatores de virulência são controlados por sistema de transdução de sinal regulador de resposta à histidina quinase de dois componentes, conhecido também como TCSs. Esse sistema de bicomponente é conservado e essencial para a sobrevivência das células bacterianas. Por sua relevância na viabilidade celular esse sistema foi alvo para uma classe de compostos antimicrobianos como, por exemplo, a vancomicina (BARRETT & HOCH, 1998; STEPHENSON & HOCH, 2002). O sistema de dois componentes YycG/YycF citado anteriormente é específico para bactérias Gram-positivas e em um estudo de mutação do sistema na espécie *S. aureus* mostrou ser essencial para sobrevivência bacteriana em situações de variação de temperatura. Ainda em *S. aureus*, foi sugerido que o sistema YycG/YycF tem função relacionada a permeabilidade da membrana (MARTIN et al., 1999). Foi demonstrado que há uma relação entre o sistema YycG/YycF e a resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, além da síntese do antígeno secretado *SsaA* (MARTIN et al., 2002).

O sistema YycG/YycF ainda regula genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo da parede celular, sistemas de transporte ligados à membrana, patogenicidade e duas principais proteínas antigênicas *SsaA* e *IsaA*. A relação do antígeno estafilocócico secretado A com o sistema YycG/YycF se dá através da regulação pela proteína codificada por *yycF* que se liga a uma região promotora do gene *ssaA* (DUBRAC & MSADEK, 2004). Em 2002 Martin e colaboradores demonstraram que a hipersensibilidade aos antibióticos MLSB de um mutante *yycF* sensível a temperatura poderia ser suprimida pela superexpressão de *ssaA*, em seguida sugeriram que a expressão desse gene poderia ser regulada pelo sistema YycF do

TCS YycG/YycF. Em 2004 Dubrac e Msadek conseguiram demonstrar de forma eficiente que de fato há a ligação de YycF a região promotora de *ssaA*, confirmando dessa maneira a hipótese sugerida por Martin em 2002 e finalmente sugeriram que aparentemente a transcrição de *ssaA* é regulada diretamente por YycF.

Lang e colaboradores, em 2000, realizaram a identificação de proteínas durante o processo de infecção causado por *S. epidermidis*, no estudo em questão, eles identificaram proteínas antigênicas estafilocócicas secretadas durante um quadro grave causado pela infecção por *S. epidermidis*, a endocardite. Eles detectaram níveis mais elevados de anticorpos IgG anti-SsaA em soro de paciente acometido por endocardite causada por *S. epidermidis*, entretanto não foram observados níveis significativos desses anticorpos em outros tipos de infecção causada por *S. epidermidis*, o que poderia indicar que *SsaA* foi fortemente expressa apenas neste tipo de infecção por *S. epidermidis*. Nesse estudo os autores identificaram pela primeira vez a presença da proteína *SsaA*, que até então não tinha sido descrita para a espécie *S. epidermidis*.

Ainda referente ao estudo citado anteriormente, Lang e colaboradores também verificaram que a recente proteína *SsaA* identificada em *S. epidermidis* possuía uma forte homologia com duas outras proteínas de *S. aureus*: SceB e um proteína de biossíntese de estafiloxantina. Estudos demonstraram a importância da estafiloxantina em *S. aureus* que é um pigmento carotenoide que confere a cor amarelada das colônias bacterianas, quando a síntese de estafiloxantina é inibida observa-se que a virulência do patógeno é atenuada, enquanto bactérias que são transformadas para a superexpressão de estafiloxantina aumentam significativamente a sua patogenicidade. Isto sugere fortemente que esse carotenóide é necessário para virulência da espécie (HOLT et al., 2011). A estafiloxantina é encontrada na membrana celular da bactéria e desempenha função relacionada a proteção contra danos provocados por radicais livres de oxigênio (CLAUDITZ et al., 2006).

Oliveira e colaboradores em 2014, identificaram proteínas secretadas e de superfície de isolados de *S. saprophyticus* que demonstraram capacidade de estimular a resposta imune em camundongos. Dentro do conjunto de proteínas identificadas por esse estudo pioneiro em imunoproteômica de *S. saprophyticus*, destacaram-se três proteínas: antígeno imunodominante A (*IsaA*), uma enolase imunogênica e o antígeno estafilocócico secretado A (*SsaA*), que foi pela primeira vez identificado em isolados de *S. saprophyticus* neste estudo que analisou a proteômica e imunoproteômica das proteínas secretadas por esta bactéria patogênica. Em estudos anteriores as proteínas, citadas anteriormente, foram identificadas nas outras espécies do gênero *Staphylococcus*, principalmente em *S. aureus* e *S. epidermidis* e são consideradas

como prováveis fatores de virulência, a proteína *SsaA* é conservada no gênero (LANG *et al.*, 2000; LORENZ *et al.*, 2011).

A análise dos perfis de proteínas através de exoproteoma de diferentes linhagens de *S. saprophyticus*, demonstrou que há variabilidade do repertório de proteínas secretadas, apesar da proteína *SsaA* ser considerada clássica - ou seja, altamente conservada no gênero *Staphylococcus* - essa análise apresentou um resultado inusitado. Foi constatado que a cepa que não apresentava a síntese de cápsula, um fator considerado importante durante a infecção, não apresentou também a secreção da proteína *SsaA*, indicando dessa maneira a versatilidade dos perfis proteicos das diferentes linhagens de *S. saprophyticus* (Oliveira *et al.*, 2018).

Nesse mesmo estudo de comparação dos perfis dos exoproteomas de três cepas distintas de *S. saprophyticus* Oliveira e colaboradores em 2018 avaliaram a porcentagem de proteínas estafilocócicas classificadas como antigênicas. Observaram que essas proteínas foram detectadas em maiores quantidades em uma cepa que apresenta cápsula espessa (denominada 9325) do que em comparação com as outras cepas estudadas (cepa referência ATCC 15305 que contém cápsula de tamanho padrão da espécie e uma cepa acapsular, denominada 7108). Em especial, foram detectados dois antígenos secretados putativos (Q49ZL8 e Q49ZM2) e o antígeno secretado *SsaA* (Q49VK7), todos mais expressos na cepa 9325.

Mesmo com os dados disponíveis na literatura ainda não se sabe, até o presente momento, qual a função determinante da proteína em questão (*SsaA*): se ela possa fazer parte de um mecanismo que facilite a infecção e permanência de *S. saprophyticus* no hospedeiro ou se está relacionada ao reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro para promover fagocitose e possível evasão do patógeno.

1.5- Enzima Amidase

Como observado em um levantamento realizado na literatura, a princípio as enzimas amidases tipicamente hidrolisam o peptidoglicano reticulado entre as células filhas para que possam se separar no processo natural de divisão celular e a autólise, além disso, elas podem exercer a função de renovar o peptidoglicano durante o crescimento (VOLLMER *et al.*, 2008).

As enzimas caracterizadas na literatura denominadas como peptidoglicanas amidases ou simplesmente como amidases são encontradas em bactérias e bacteriófagos. Na maioria dos casos como, por exemplo as *MurNac*-LAAs que são amidases pertencentes ao sistema autolítico

bacteriano possuem peptídeo sinal na porção N terminal que possibilita o seu transporte através da membrana celular para o ambiente exterior (LOPEZ et al., 1981; YOUNG, 1992).

Um outro exemplo de amidase que podemos citar é a LytH que aparentemente está relacionada ao crescimento celular. Na sua ausência, a síntese de peptidoglicano se torna especialmente desregulada, o que faz com que as células cresçam tanto que a divisão celular apresenta defeitos que comprometem o ciclo celular diminuindo a população bacteriana. Nesse mesmo estudo eles proseguiram com os experimentos para tentar verificar a atividade enzimática dessa amidase *in vitro*, eles tinham evidência da atividade da enzima LytH nas células, entretanto eles não tiveram sucesso em reproduzir a atividade enzimática *in vitro*. Assim sendo, eles sugeriram que provavelmente a proteína LytH faz parte de um complexo proteico maior e que as proteínas desse complexo poderiam auxiliar na atividade observada *in vivo* ou que essa enzima precisa de uma proteína parceira para a sua ativação, provavelmente o uso da proteína LytH isolada e purificada não apresentaria a mesma função ou teria um efeito menor se tivesse coexpressa ou copurificada (DO et al., 2020).

2.0 JUSTIFICATIVA

Por ser um patógeno que é responsável por grande parte dos casos diagnosticados de infecção do trato urinário em mulheres, é inevitável que se desenvolvam estudos acerca dos mecanismos que *S. saprophyticus* utiliza para conseguir, de forma eficiente, infectar e colonizar os tecidos e órgãos do hospedeiro. É importante ressaltar que *S. saprophyticus* pode causar infecções em pacientes saudáveis e fora do ambiente hospitalar (BECKER et al., 2014). A maioria das informações disponíveis para o gênero *Staphylococcus* relacionados a fatores de virulência e as respostas do hospedeiro concentram-se em *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em alguns casos a espécie *S. saprophyticus* também representa uma preocupação de saúde pública, quando não tratada de maneira eficiente pode evoluir para quadros clínicos mais graves e algumas cepas já demonstraram resistência à meticilina (HIGASHIDE et al., 2008; MAŁYSZKO et al., 2014).

Considerando a espécie *S. saprophyticus*, pouco se conhece sobre as estratégias que essas bactérias utilizam durante o processo de infecção, assim como os seus mecanismos secundários de defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro. Em 2014 nosso grupo de pesquisa constatou, pela primeira vez, em um estudo pioneiro de imunoproteoma, a presença da proteína *SsaA* em cepas de *S. saprophyticus* que apresentou uma intensa capacidade de deflagrar o sistema imunológico de camundongos (OLIVEIRA et al., 2014). Em outras espécies do

gênero *Staphylococcus* a proteína *SsaA* foi considerada um provável fator de virulência, entretanto estudos posteriores para elucidar a função determinante de tal proteína, são necessários (LANG et al., 2000; LORENZ et al., 2011).

Aqui, neste estudo, propomos a caracterização da proteína *SsaA* em *Staphylococcus saprophyticus* com o intuito de obtermos maiores informações sobre a relação entre a proteína em questão e o processo de infecção por *S. saprophyticus* e abrir novas perspectivas que podem contribuir para a compreensão dos mecanismos utilizados por esse patógeno.

3.0 OBJETIVOS

O estudo proposto tem como objetivo principal caracterizar a proteína *SsaA* em *Staphylococcus saprophyticus*, utilizando estratégias *in silico*, e modelo *ex vivo* de infecção.

Como objetivos específicos:

- I- Caracterizar a proteína *SsaA* usando estratégias *in silico*
- II- Verificar a importância da proteína *SsaA* durante o processo de infecção com macrófagos J774 por meio do bloqueio da proteína com anticorpos policlonais anti-*SsaA*;
- III- Obter a proteína *SsaA* induzida e purificada;

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Caracterização *in silico* da proteína *SsaA*

Para as etapas iniciais da caracterização da proteína *SsaA* foi utilizado algumas ferramentas de bioinformática para prever sua conformação tridimensional, sítios enzimáticos e regiões de interação de proteína/proteína. A sequência da proteína *SsaA* que foi utilizada durante as análises *in silico* foi obtida após uma busca nas informações contidas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) número de acesso: BAE177 58.1. A sequência obtida da proteína foi submetida nos servidores on-line e bancos de dados para análises posteriores. Foi empregado o algoritmo SignalP versão 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para a predição de peptídeo sinal na sequência da proteína *SsaA*. Para a predição da estrutura tridimensional da proteína *SsaA* e as etapas iniciais de modelagem de proteína foi utilizado o servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) seguindo os protocolos de validação previamente estabelecidos (ROY et al., 2010).

A análise do domínio CHAP com função de amidase predito na proteína *SsaA* foi realizada através dos bancos de dados BioCyc (<https://biocyc.org/>) em conjunto com o UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e o banco de dados Pfam versão 32.0 (<https://pfam.xfam.org/>). A predição dos epítomos da sequência da proteína *SsaA* foi feita utilizando o servidor ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>) usando os protocolos descritos recomendados por Saha e Raghava em 2006. Posteriormente foi utilizado o programa PyMOL versão 1.3 para visualizar e analisar a estrutura tridimensional da proteína *SsaA* predita pelo I-TASSER, assim como na produção de imagens de alta qualidade.

4.2- Avaliação da relevância da secreção de *SsaA* durante a interação com macrófagos murinos J774 1.6

Para analisar a importância da proteína *SsaA* durante a interação com células fagocíticas, foi realizado um ensaio de fagocitose na presença e ausência de anticorpos anti-*SsaA*. As células de macrófagos murinos eternizados linhagem J774 1.6 (Banco Celular do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ, número de acesso 0273) foram cultivadas meio DMEM (SIGMA – Aldrich, Missouri, EUA) contendo soro fetal bovino (SIGMA – Aldrich, Missouri, EUA) até atingirem a confluência completa em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. As células fagocíticas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para 10⁵ células/mL. Posteriormente, foi adicionado interferon gama - 10² U/mL – (SIGMA – Aldrich, Missouri, EUA) e as células foram

incubadas em placa de polipropileno de 12 poços (Corning Incorporated, Costar), 1 mL para cada poço e incubadas durante 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

As células de *S. saprophyticus* foram pré-inoculadas durante 16 horas em meio BHI (KASVI – Laboratórios Conda S.A) e posteriormente foram utilizadas para realizar um inóculo (1% do pré-inóculo) em meio BHI. Em seguida, o crescimento bacteriano foi monitorado até a densidade óptica em 620 nm atingir 0,2 ($D.O_{(620)} = 0,2$) o que corresponde a aproximadamente 5×10^7 células de *S. saprophyticus*. Após, as células foram transferidas para 3 tubos de 1,5 mL (Axygen) e incubada nas condições descritas a seguir: células de *S. saprophyticus* mais anticorpo *SsaA* (1:100), células de *S. saprophyticus* mais soro pré-imune (1:100) e apenas com células de *S. saprophyticus*.

As células de macrófagos foram incubadas com soro pré-imune durante 1 hora antes do ensaio de fagocitose. As células de *S. saprophyticus* incubadas nas condições descritas anteriormente foram aplicadas na placa de fagocitose de polipropileno de 12 poços (Corning Incorporated) com os macrófagos previamente tratados e ativados com interferon gama (10^2 U/ml) em uma concentração ajustada de 50:1 (50 células bacterianas para cada 1 célula de fagocítica), e seguiu 2 horas de incubação/interação entre as células de *S. saprophyticus* e de macrófagos em incubadora de CO₂ 5% a 37°C.

Após o ensaio de fagocitose, o sobrenadante presente nos poços da placa de polipropileno foi retirado de forma cuidadosa por pipetagem, em seguida cada poço foi lavado com 1 mL de PBS 1X estéril, permitindo dessa forma que apenas os macrófagos aderidos no fundo do poço permaneça presentes e posteriormente as células de macrófagos foram lisadas com água ultrapura (Milli-Q) durante 10 min. Após essa incubação, o sobrenadante de cada poço foi recolhido em tubos de 1,5 mL (Axygen) e centrifugados 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos com PBS 1X no mesmo volume inicial, depois foram diluídas 1:100 e pipetado 10 µl em placas de Petri contendo 20 mL de meio BHI (KASVI – Laboratórios Conda S.A) sólido previamente preparadas. As placas foram incubadas durante 16 horas em estufa a 37°C. O índice de fagocitose foi avaliado pelo método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

4.3- Análise estatística

Foi realizado um teste t de *Student* para confirmar a relevância da diferença apresentada das células patogênicas recuperadas após o ensaio de fagocitose entre as condições controles e a condição tratada com os anticorpos anti-*SsaA*. Foi estabelecido um p-valor de 0.05.

4.4- Autoindução da proteína *SsaA* através de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificação de *SsaA* recombinante

As etapas de clonagem em vetor de expressão heteróloga foram realizadas por nosso grupo de pesquisa como detalhado por Isabella I. R. Rosa em sua Dissertação “Clonagem e expressão heteróloga do antígeno *SsaA* de *Staphylococcus saprophyticus* e Avaliação da secreção durante interação com macrófagos” em 2016, foi usado o vetor de expressão comercial pGEX-4T3 (GE Helthcare) e posteriormente seguiram com as etapas de ligação dos fragmentos purificados da sequência codificadora da proteína *SsaA* ao vetor de expressão linearizado em fusão a proteína Glutathione-S-Transferase (GST) através do sistema de clonagem *Infusion HD Cloning kit* (Clonotech) de acordo com o protocolo do fabricante.

As células termocompetentes de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pLysS foram transformadas com os vetores de expressão citados anteriormente pelo método de choque térmico seguindo as recomendações que se encontram no protocolo de Sambrook e Russel de 2001. Após a transformação as células bacterianas foram mantidas durante 16 h em placas de Petri contendo meio BHI sólido, ampicilina e glicose a 20 mM (NEON, Suzano, Brasil).

Para a etapa da expressão da proteína *SsaA*, foi utilizado o método de autoindução (baseado no método descrito por Studier em 2005 com algumas modificações) que consistiu em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado o pré-inóculo em um tubo de 50 mL (Corning) contendo 25 mL de meio LB - Luria Bertani – (SIGMA – Aldrich, Missouri, EUA), 20 µl de ampicilina e uma colônia de *E. coli* contendo o plasmídeo com a sequência codificadora da proteína *SsaA*. Posteriormente o pré-inóculo foi incubado durante 16 h a 37°C sob agitação de 150 rpm. Na segunda etapa foi preparado o meio base da autoindução que consistiu na adição de 6 g NaHPO₄ (SIGMA – Aldrich), 3 g de KH₂PO₄ (SIGMA – Aldrich), 20 g de triptona (KASVI – Laboratórios Conda S.A), 5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl (SIGMA – Aldrich) em 800 mL de água destilada. Posteriormente a esterilização, foi adicionado ao meio base de autoindução: 10 mL de glicerol 60% (v/v), 5 mL de glicose 10% (m/v) e 25 mL de lactose 8% (m/v). Em seguida foi adicionado os sais: 50 mL de NH₂Cl 1M, 5 mL de Na₂SO₄

1M e 1 mL de $MgSO_4$ (SIGMA – Aldrich). Essas soluções foram esterilizadas usando sistemas de filtros 0.22 e 0.45 μm (Millipore) e em seguida adicionadas ao meio de base de autoindução.

Foi realizado o inóculo (25 mL do pré-inóculo) ao meio de autoindução contendo os sais e os açúcares. Em paralelo, foi retirado 1 mL do meio para ser usado como ponto zero, ou seja, sem indução. O inóculo foi incubado durante 24 h a 37°C sob agitação 200 rpm. Em seguida, o meio foi centrifugado por 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C e o *pellet* formado foi guardado para as etapas seguintes. Posteriormente foi preparado um gel de poli-acrilamida 12% para verificar se houve a indução da proteína *SsaA*.

4.5- Solubilização e purificação da proteína *SsaA*

Para a solubilização, as amostras foram incubadas por 30 minutos com uma concentração final de 100 $\mu g/mL$ de lisozima (SIGMA - Aldrich, Missouri, EUA) sob agitação leve a 37°C, em seguida foram submetidas a quatro ciclos de sonicação por 10 minutos cada ciclo com intervalos de 5 minutos em gelo acompanhados por 30 segundos em agitador vortex. O sonicador foi ajustado para uma potência máxima de sonicação de 75%, em todas as etapas as amostras ficaram em gelo para assegurar que não houvesse perda da estrutura nativa da proteína por desnaturação térmica. Logo após as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE para a confirmação da solubilização.

A purificação da proteína *SsaA* foi feita através de sistema de afinidade usando glutationa imobilizada em uma matriz de sefarose, a parte específica da proteína marcada com o *tag* GST se liga a matriz possibilitando a separação de outras proteínas e impurezas nas etapas de lavagem. Posteriormente foi realizado a etapa de separar a proteína *SsaA* da *tag* GST usando a proteína trombina. Os procedimentos foram feitos usando como base o manual *GST Gene Fusion System*.

Para a etapa de ligação da proteína à matriz de sefarose, foi adicionado 250 μl de resina sefarose em um tubo de 1,5 mL (Axygen) e posteriormente foi centrifugado durante 5 minutos a 800 rpm, ao final da centrifugação a fase do sobrenadante foi coletada e descartada. Em seguida foi adicionado ao tubo 1 mL de PBS 1X gelado, logo após mais uma centrifugação como descrito anteriormente, o sobrenadante foi descartado e no mesmo tudo foi adicionado 500 μl do sobrenadante proveniente da etapa de solubilização e seguiu uma incubação, com o

sobrenadante solubilizado mais a resina de sefarose ativada com 1 mL de PBS 1X, durante 3 h sob agitação leve a temperatura ambiente.

Ao final da incubação de 3 h, o tubo (Axygen) contendo o sobrenadante solubilizado mais a resina de sefarose foi centrifugado a 800 rpm durante 5 minutos, logo após a porção do sobrenadante foi recolhida e guardada para uso posterior. Nesse mesmo tubo foi adicionado 500 µl de PBS 1X e seguiu para a etapa de centrifugação como descrito anteriormente, o sobrenadante foi coletado após a centrifugação e foi guardado em novo tubo (Axygen), foram realizadas mais quatro lavagens como essa e ao final da coleta do último sobrenadante, foi adicionado à resina presente no fundo do tubo 100 µl de PBS 1X e em seguida o tubo foi estocado a uma temperatura de 4°C.

Para as etapas finais de purificação da proteína *SsaA* foi realizada uma tentativa de separar a proteína *SsaA* do *tag* GST utilizando a enzima trombina. Os procedimentos seguiram os seguintes passos: em um tubo de 1,5 mL (Axygen) foi adicionado 50 µl de resina sefarose ligada a proteína *SsaA* do experimento anterior, em seguida 50 µl de enzima trombina e posteriormente foi incubado durante 16 h a temperatura ambiente sob agitação leve, ao final da incubação a amostra foi centrifugada 500 g durante 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado.

5. RESULTADOS

5.1- Análises *in silico* da proteína *SsaA*

Para os primeiros passos da caracterização da proteína *SsaA* foi verificado se em sua sequência haveria o peptídeo sinal, como ela foi identificada inicialmente no exoproteoma de *S. saprophyticus*, foi realizada uma avaliação da sequência de aminoácidos da proteína *SsaA* para predição de peptídeo sinal. Proteínas que possuem peptídeo sinal geralmente são secretadas por vias clássicas. Em bactérias são conhecidos pelo menos sete sistemas de secreção (TSENG et al., 2009). Foi utilizado servidor online SignalP versão 5.0 para a análise da sequência de aminoácidos da proteína de interesse (**Figura 2**).

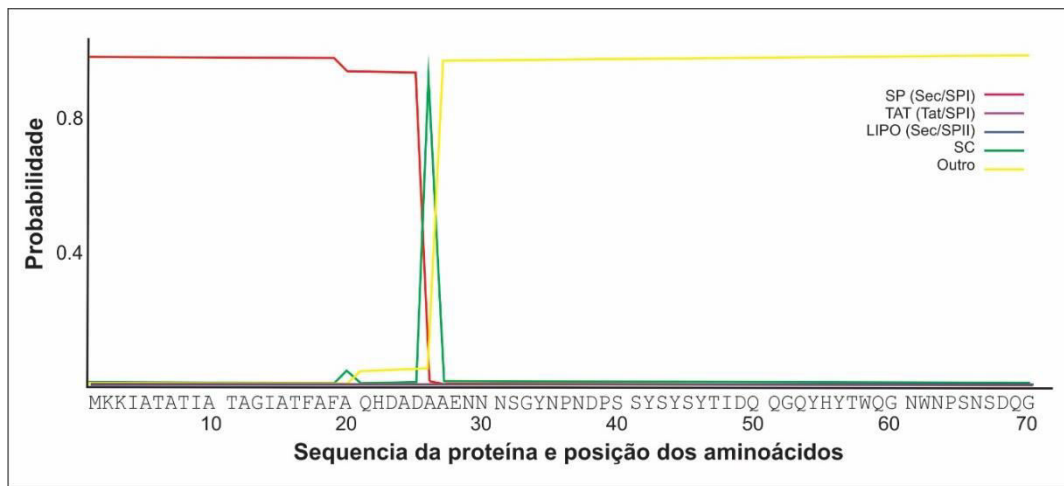


Figura 2. Resultado da predição do peptídeo sinal da proteína *SsaA* usando o servidor SignalP -5.0. No eixo horizontal está representado os aminoácidos constituintes da proteína e no eixo vertical a estimativa da probabilidade de ocorrência do peptídeo sinal. SP: peptídeo sinal Sec/SPI; TAT: peptídeo sinal da proteína TAT; LIPO: peptídeo sinal da lipoproteína Sec/SPII.

A análise da sequência da proteína *SsaA* através do servidor SignalP indicou a predição de um peptídeo sinal Sec com uma probabilidade de 0,997 com localização do sítio de clivagem entre o aminoácido 26 – 27. A constatação da presença deste peptídeo sinal sugere que a proteína *SsaA* pode ser secretada por vias clássicas de secreção. Para que as proteínas secretadas desempenhem as suas funções no exterior do citoplasma, elas geralmente são marcadas na extremidade N-terminal com um peptídeo sinal e posteriormente esse sinal é clivado pela ação das enzimas peptidases sinal que são classificadas como proteases e atuam na liberação de proteínas (TJALSMA et al., 2000; SIBBALD et al., 2006).

Uma busca da estrutura cristalográfica da proteína *SsaA* em *S. saprophyticus* foi realizada no *Protein Data Bank* (PDB), esse banco de dados fornece informações relacionadas a estrutura 3D de proteínas, entretanto o resultado gerado pela pesquisa mostrou uma estrutura com baixa cobertura para a proteína de interesse, portanto submetemos a sequência da proteína *SsaA* no servidor I-TASSER para gerar a predição mais completa da estrutura tridimensional da proteína *SsaA* (**Figura 3**). Foi considerado o *C-score* que é a pontuação de confiança para estimar a qualidade dos modelos preditos pelo I-TASSER, este *score* está tipicamente na faixa (-5 a 2), um *C-score* de maior valor significa um modelo com alta confiança predita.

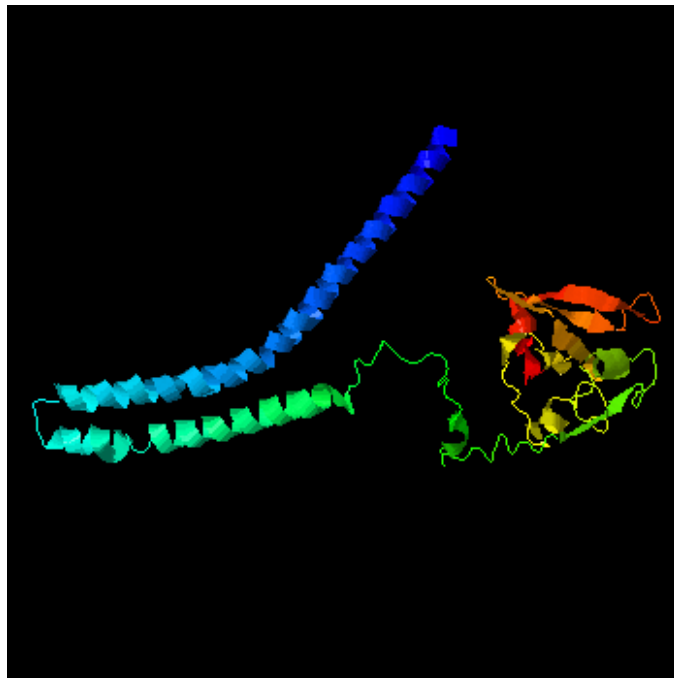


Figura 3. Modelo gerado pelo servidor I-TASSER para a proteína *SsaA* de *S. saprophyticus*. Valor de *C-score* = -1.14.

A estrutura do modelo de *SsaA* apresentou uma conformação de uma grande alça e uma porção globular (**Figura 3**). No final, foi gerado um arquivo do modelo selecionado no formato .pdb (esse formato permite a visualização tridimensional da proteína em softwares de modelagens de proteínas), posteriormente esse arquivo foi utilizado para as análises seguintes.

Com o objetivo de compreender melhor as possíveis funções da proteína *SsaA*, seguimos com as análises em vários bancos de dados de proteínas como, por exemplo, BioCyc em conjunto com o UniProt e o banco de dados Pfam versão 32.0, em busca de domínios presentes na proteína. Como resultados obtivemos a localização de um domínio CHAP com função de

amidase, o domínio CHAP está representado na **Figura 4 A**. O domínio CHAP está localizado entre o aminoácido 134 – 216 cobrindo uma grande parte da proteína. O domínio CHAP é uma região conservada em proteínas bacterianas, entretanto a maioria dessas proteínas não são caracterizadas. Inicialmente foi proposto que elas podem funcionar principalmente como na hidrólise de peptideoglicano. A região CHAP está associada a várias famílias de domínios amidase. Em proteínas contendo o domínio CHAP foi sugerido que elas usam resíduos de cisteína em um tipo de mecanismo de ataque nucleofílico (BATEMAN & RAWLINGS, 2003).

Além da constatação do domínio CHAP, analisamos também a presença de epítomos antigênicos na sequência da proteína *SsaA*. A **Figura 4 B** apresenta a localização dos epítomos identificados no modelo tridimensional de *SsaA* predito. A predição dos epítomos foi feita no servidor ABCpred que apresenta uma capacidade de predição de epítomos de 65,93% de precisão usando redes neurais recorrentes. Regiões de aminoácidos que apresentam a capacidade de interagir com receptores de células correspondem a porções relevantes de uma determinada proteína para o estudo de respostas imunológicas.

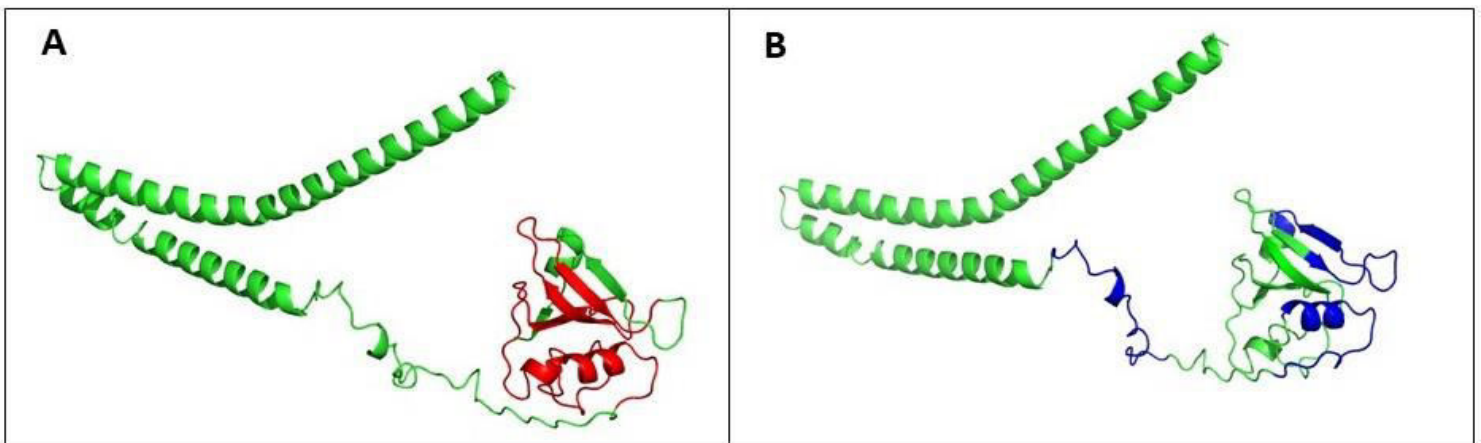


Figura 4. Modelo predito para a proteína *SsaA* através do programa PyMOL versão 1.3. Na figura **A** em vermelho foi destacado a região correspondente ao domínio CHAP da proteína *SsaA*. Na figura **B** os epítomos preditos na sequência da proteína *SsaA* foram destacados em azul.

Com o objetivo de aprofundar as análises *in silico* de *SsaA*, fizemos uma busca no banco de dados STRING para verificar as possíveis interações entre proteína-proteína. O STRING contém várias informações acerca de interações entre proteínas, utiliza recursos de várias fontes como, por exemplo, experimental, método de predição computacional e fonte de publicações, possuindo informações sobre 9,6 milhões de proteínas. Os resultados obtidos no STRING não indicaram interações claras entre a proteína *SsaA* com as demais proteínas depositadas nos bancos de dados. Este dado reforça ainda mais a necessidade de estudos que caracterizam a

proteína de interesse, já que é considerada conservada no gênero *Staphylococcus*. Curiosamente, um estudo realizado em 2018 por Oliveira e colaboradores demonstrou que uma cepa específica (7108) não secretava a proteína *SsaA*. Os dados transcricionais do estudo detectaram altos níveis de transcritos que codificam a *SsaA*, e foi sugerido que é provável que ocorra uma regulação pós transcricional, justificando a ausência da produção/secreção da proteína *SsaA* por essa cepa de *S. saprophyticus*.

5.2- Ensaio de fagocitose

Com o intuito de avaliar a importância da secreção da proteína *SsaA* durante a interação com macrófagos foi realizado um ensaio de fagocitose durante 2 horas de células de *S. saprophyticus* na presença de anticorpos policlonais anti-*SsaA* diluição 1:100 em contato com os macrófagos murinos e além de dois controles: apenas células de *S. saprophyticus* em contato com os macrófagos e células de *S. saprophyticus* na presença de soro pré-imune (1:100) em contato com as células fagocíticas. Todos os ensaios de fagocitose foram realizados com macrófagos J774 previamente tratados e ativados nas condições previamente descrita por Souza et al., 2019.

O resultado do experimento revelou que na condição em que a proteína *SsaA* foi bloqueada com soro contendo os anticorpos anti-*SsaA* houve uma redução de aproximadamente 50% do número de células recuperadas de *S. saprophyticus* após a lise dos macrófagos em comparação com a condição controle (**Figura 5**). Este resultado sugere que *SsaA* é importante para promover apresentação das células bacterianas às células macrofágicas pois a presença dos anticorpos anti-*SsaA* (que interagem com as moléculas de *SsaA* e impedem as mesmas de realizarem esta ação) reduz o número de células fagocitadas pelos macrófagos.

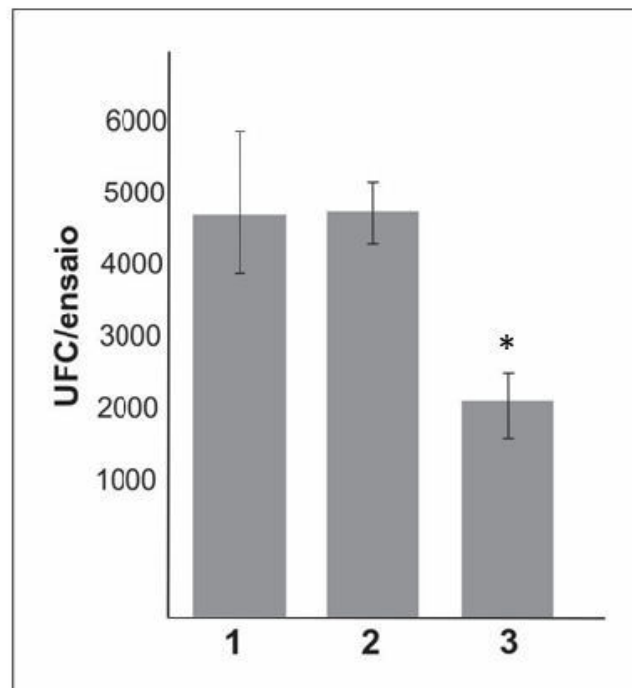


Figura 5. Avaliação do índice de fagocitose após o tratamento com anticorpo *SsaA*. **1** - *S. saprophyticus*; **2** - Células de *S. saprophyticus* tratadas com soro pré-imune e **3** - Células de *S. saprophyticus* na presença de anti-*SsaA*. * = $p \leq 0,05$. O experimento de fagocitose foi realizado em triplicata.

Estudos prévios realizados por nosso grupo em 2016 (Rosa e colaboradores) demonstraram através de um experimento de imunofluorescência utilizando anti-*SsaA* que a proteína *SsaA* é secretada por *S. saprophyticus* após a internalização por macrófagos. Foi detectada a presença de *SsaA* na superfície de bactérias fagocitadas por macrófagos e dispersa no citoplasma dos macrófagos após a internalização de células de *S. saprophyticus* sugerindo que *SsaA* tenha importância durante a interação de *S. saprophyticus* com células de defesa do hospedeiro.

5.3- Autoindução, solubilização e purificação da proteína *SsaA*

Após a etapa da expressão de proteínas em meio de autoindução, foi preparado um gel de poliacrilamida 12% para a confirmação da indução da proteína *SsaA* (**Figura 6**). A proteína *SsaA* fusionada a GST tem o tamanho aproximado de 51 kDa, é possível identificar a indução da proteína *SsaA* após 24 h de incubação no meio de autoindução em comparação ao ponto zero, sem indução. Uma vez confirmada a indução da proteína de interesse, as amostras foram

solubilizadas. No final do procedimento foi realizado um gel SDS-PAGE para confirmar se de fato houve solubilização da proteína *SsaA* como pode ser observado na **Figura 6**.

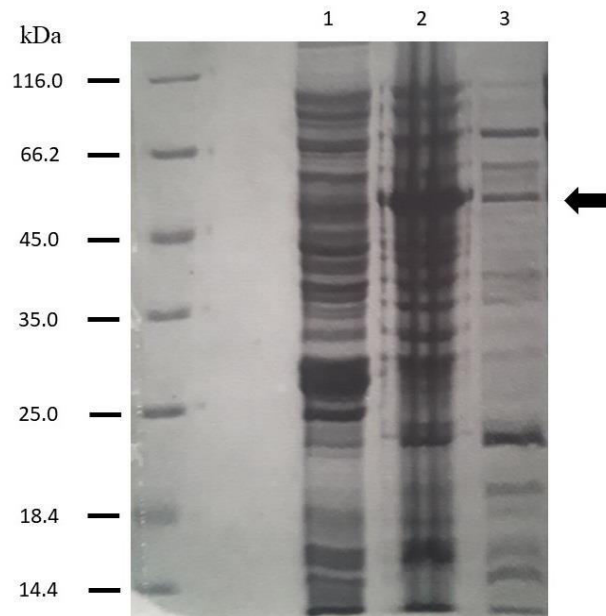


Figura 6. Gel unidimensional de poliacrilamida mostrando a indução e a solubilização da proteína *SsaA.1* - Ponto zero, sem indução; **2** – autoindução da proteína *SsaA* e **3** – Sobrenadante da solubilização; A seta indica a posição da banda correspondente a proteína *SsaA* (tamanho de aproximadamente 51kDa).

Após a constatação da solubilização da proteína de interesse, foi realizado as etapas iniciais da purificação da proteína *SsaA*. A amostra solubilizada foi colocada em contato com a matriz de sefarose para que ocorresse a ligação da proteína *SsaA* contendo a região *tag* GST que apresenta afinidade com a resina de sefarose desse modo as impurezas e as outras proteínas desnecessárias poderiam ser retiradas da matriz. Na **Figura 7** é possível observar a ligação da proteína *SsaA* a matriz de sefarose através de um SDS-PAGE.

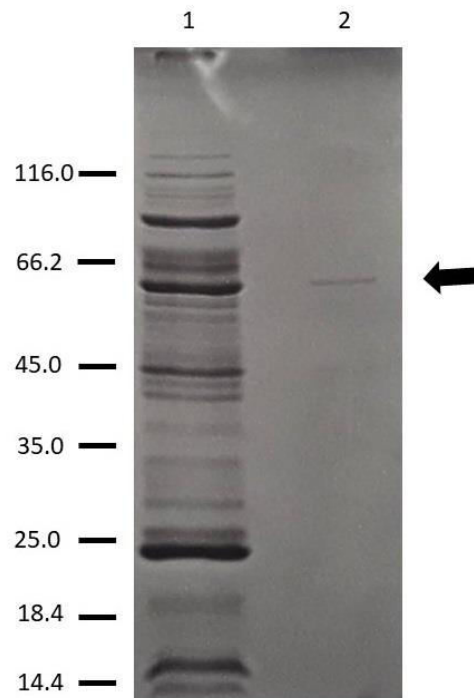


Figura 7. SDS-PAGE mostrando a solubilização da proteína *SsaA* e a ligação da proteína à resina de sefarose. **1** – Solubilização do sobrenadante da indução de *SsaA*; **2** – Resina de sefarose contendo a proteína *SsaA*. A seta indica a posição da banda correspondente a proteína *SsaA*.

Depois da confirmação da ligação da proteína *SsaA* à resina de sefarose, tentamos separar a proteína do *tag* GST para a etapa final de purificação, foi usada a enzima trombina para clivar a região específica entre a sequência da proteína *SsaA* e o *tag* GST, entretanto o resultado não foi satisfatório e os dados indicaram que não houve a separação da proteína do *tag* GST. Provavelmente a enzima não foi eficiente na atividade de clivagem da sequência.

6.0 DISCUSSÃO

A secreção de proteínas por bactérias patogênicas desempenha funções centrais na modulação das interações entre patógeno-hospedeiro. São descritos pelo menos sete sistemas de secreções de proteínas em bactérias – sistema de secreção I ao VII. Através de investigações dos genomas bacterianos verificou-se a complexidade de alguns desses sistemas de secreção. As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam particularidades nas vias de secreção como, por exemplo, em Gram-negativas as proteínas secretadas precisam passar através da membrana interna e externa utilizando pelo menos seis dos sistemas de secreção. Entretanto, as bactérias identificadas como Gram-positivas podem compartilhar alguns desses sistemas com as bactérias Gram-negativas como observado em um levantamento realizado por Tseng e colaboradores em 2009.

Foi relatado que em bactérias Gram-negativas que algumas proteínas são secretadas pela membrana interna e externa em apenas uma etapa pelos sistemas I, III, IV ou VI. Enquanto outras proteínas são transportadas para o espaço periplásmico via Sec universal ou via duas-argininas (TAT) e posteriormente são transportadas através da membrana externa pelos sistemas de secreção do tipo II, tipo V ou pelo tipo I (raramente). Já nas bactérias Gram-positivas, as proteínas secretadas são comumente transportadas através da membrana única pelo sistema Sec ou via duas-argininas (TAT). Entretanto em algumas bactérias Gram-positivas que apresentam uma parede celular hidrofóbica quase impermeável, um sistema específico de secreção, tipo VII, transporta as proteínas através da membrana e da parede celular por um sistema de canal, ainda não está claro se trata de um processo de uma única etapa ou duas (TSENG et al., 2009). A predição de peptídeo sinal realizada com a sequência da proteína *SsaA* (**Figura 2**), sugere que ela possa ser secretada por vias clássicas de secreção como, por exemplo a via Sec.

Parte da dificuldade encontrada na etapa de solubilização no decorrer deste estudo pode estar relacionada à produção da proteína heteróloga contendo o peptídeo sinal na sequência da proteína *SsaA*. A longa alça demonstrada pela predição da estrutura da proteína poderia conferir uma hidrofobicidade à proteína recombinante ou dificultaria a ação do sistema de secreção da bactéria *E. coli*. Uma alternativa para contornar esse obstáculo é que se construam iniciadores, desconsiderando a região do peptídeo sinal, assim eliminando essa porção N terminal e produzindo uma proteína recombinante mais hidrofílica e menor.

Por ser uma proteína conservada no gênero e - como observado por Oliveira e colaboradores em 2014 - a proteína *SsaA* é altamente secretada por *S. saprophyticus*, a

elucidação da função durante o processo de infecção torna-se importante já que ela é imunogênica. Uma das etapas para a compreensão da função de proteínas é verificar como a proteína está organizada estruturalmente, no caso da proteína *SsaA* uma busca foi realizada no *Protein Data Bank* (PDB); entretanto não foram encontradas muitas informações a respeito da proteína e o modelo disponibilizado por esse banco de dados cobria apenas uma pequena parte da sequência da proteína. Os dados disponibilizados pelo PDB a respeito de uma proteína são obtidos por cristalografia de raio-X e espectroscopia de proteínas por ressonância magnética nuclear, desse modo optamos por usar um servidor online I-TASSER para a predição da proteína *SsaA*, já que dessa maneira poderíamos obter uma predição da estrutura da proteína completa e não apenas uma pequena porção da sequência de aminoácidos da proteína *SsaA*.

A predição da estrutura de uma proteína pode ser realizada *in silico* através de servidores que utilizam bancos de dados com informações de várias proteínas gerando um modelo tridimensional predito da proteína de interesse. As estruturas protéicas podem ser variadas, podendo ser compostas por alfa-hélice, folha-beta e regiões conhecidas como *loop* e são modeladas usando técnicas de bioinformática. A modelagem de uma proteína possibilita a extração de informações relevantes como, por exemplo, o número de folhas-beta, alfa-hélice e quantidade de *loops*, localização dos resíduos que participam da atividade catalítica, distância entre resíduos e tamanho da área superficial molecular (ROY et al., 2010).

Uma abordagem futura que pode complementar a predição da estrutura e assim compreender melhor como a proteína *SsaA* pode atuar é a Dinâmica Molecular de Proteína, essa abordagem fornece informações, através de simulações computacionais, sobre o comportamento dinâmico dos átomos que formam a molécula, assim poderíamos prever qual seria o movimento ao longo do tempo da proteína *SsaA* como, por exemplo, exposição de domínio ou conformação até sua forma nativa (LIWO et al., 2005).

Como observado na **Figura 3** obtivemos a predição da estrutura da proteína *SsaA* usando como guia as recomendações que constam no trabalho de Roy e colaboradores publicado em 2010. Dados deste trabalho foram utilizados não apenas na submissão da sequência da proteína *SsaA*, mas também nas etapas de validação. Os dados sugerem que a proteína *SsaA* pode ter uma conformação muito próxima aquela apresentada na **Figura 3**, o modelo com melhor *score* apresentou uma longa alça e uma região globular na outra porção. Curiosamente as análises realizadas nos bancos de dados BioCyc em conjunto com o Uniprot e o Pfam indicaram que nessa região globular da proteína *SsaA* está presente um domínio CHAP com função predita para amidase.

Na sequência da proteína *SsaA*, esse domínio CHAP cobre uma grande parte interna da região globular da proteína, demonstrando assim que é provável que esse sítio de atividade enzimática seja funcional na proteína *in vivo*. Esse domínio CHAP geralmente funciona em associação com outros domínios que apresentam a função de clivar o peptidoglicano em células bacterianas. A parede de peptidoglicano confere uma certa proteção e resistência à célula bacteriana. Entretanto, a parede celular deve ser dinâmica ao ponto de expandir durante o crescimento celular e clivar peptidoglicano durante divisão celular ou lise. Proteínas relacionadas ao metabolismo de peptidoglicano geralmente apresentam domínios com funções que modulam constantemente sua deposição/síntese (BATEMAN & RAWLINGS, 2003).

Em um estudo recente conduzido por Truc Do em 2020, foi sugerido que a proteína LytH - uma amidase de *S. aureus* - está relacionada com a regulação de peptidoglicano, para exercer a sua função *in vitro* seria necessário a presença de uma proteína parceira que desempenharia o papel de ativar a LytH. Nossas análises da proteína *SsaA* pelo banco de dado STRING não apresentou nenhuma relação clara entre a proteína *SsaA* e outras proteínas, isso demonstra a necessidade de maiores informações a respeito dessa proteína que é altamente secretada em *S. saprophyticus* (Oliveira et al., 2014).

No contexto da análise da importância da proteína *SsaA* durante o processo de infecção com células de macrófagos observado nos dados da **Figura 5**, a diminuição de células patogênicas recuperadas após o ensaio de fagocitose com macrófagos pode sugerir que a proteína *SsaA* desempenha um papel importante durante o processo de infecção principalmente na interação com as células do hospedeiro. Provavelmente a proteína *SsaA* está relacionada a apresentação das células bacterianas às células fagocíticas, já que na condição em que a proteína *SsaA* foi bloqueada com o soro contendo anticorpos anti-*SsaA* houve diminuição do índice de fagocitose.

Uma forma de analisar diretamente e eficaz a relevância da proteína *SsaA* durante o processo de infecção, seria obter a proteína purificada e usar a proteína isolada no ensaio de fagocitose, não apenas durante infecção, mas também o uso da proteína purificada poderia auxiliar na validação, por meio de atividade enzimática, do domínio CHAP com função predita de amidase que ela possui. O método expressão de proteínas utilizando o meio de autoindução provou ser eficiente como pode ser observado na **Figura 6**, o maior tempo de indução sem a presença de IPTG possibilita maior rendimento de proteína induzida e diminui a formação dos corpos de inclusão. Dessa maneira, torna menos trabalhoso as etapas seguintes para obtenção da proteína purificada.

Utilizando o método de expressão de proteínas por meio de autoindução é possível ter uma maior eficiência no passo de solubilização de proteínas como pode ser visto na **Figura 7**, apesar da proteína *SsaA* não ser tão solúvel foi possível obter uma quantidade suficiente para o passo de ligação com a resina de sefarose.

Como observado na **Figura 7**, a proteína *SsaA* ligou-se a resina de sefarose por afinidade, entretanto também observamos algumas fracas ligações inespecíficas e mesmo seguindo com os passos posteriores de purificação como a separação da proteína de sua marcação GST usando a enzima trombina, não obtivemos sucesso. Provavelmente a enzima trombina não foi eficaz na clivagem da região específica da proteína, portanto a proteína continuou fusionada a GST.

7.0 CONCLUSÃO

As análises *in silico* e em modelo *ex vivo* auxiliam na compreensão da função da proteína *SsaA* durante o processo de infecção por *S. saprophyticus*. Mesmo com os dados limitados na literatura a respeito de suas prováveis funções em outras bactérias do gênero como *S. aureus* e *S. epidermidis*, neste estudo conseguimos demonstrar que a secreção da proteína *SsaA* pode ser relevante no contexto da infecção de macrófagos por *S. saprophyticus*. As análises em bancos de dados mostraram, através de predição, que a proteína *SsaA* de *S. saprophyticus* possui um domínio conservado denominado CHAP.

Proteínas que apresentam esse domínio conservado em suas sequências foram descritas como pertencentes a família das amidases e a princípio foi proposto que elas podem funcionar como amidases principalmente na hidrólise de peptídeo-glicano, evidenciando ainda mais a importância da proteína *SsaA*.

8.0 PERSPECTIVAS

A compreensão do modo como bactérias patogênicas interagem com o hospedeiro é essencial para o estabelecimento de novas estratégias no tratamento de infecções. Assim, estudos que visam caracterizar novos alvos ou tentar elucidar a função de determinadas proteínas que estão relacionadas ao processo de infecção possibilitam novos caminhos para a pesquisa básica e conseqüentemente informações mais aprofundadas sobre quais mecanismos são utilizados durante as etapas de infecção e colonização do hospedeiro por bactérias patogênicas, como *S. saprophyticus*.

Mesmo com a compreensão de que a proteína *SsaA* seja relevante no contexto de infecção - demonstrado por nosso modelo *ex vivo* - é necessário avançar para os próximos passos seguindo as seguintes considerações: 1) verificar se de fato a sequência correspondente ao peptídeo sinal pode interferir na solubilização ou em outros processos; 2) obter a proteína purificada e validar a função de atividade amidase por análises enzimáticas *in vitro*; 3) estabelecer novas hipóteses em relação as prováveis funções da proteína *SsaA* como, por exemplo, remodelamento ou manutenção do peptidoglicano da parede celular e/ou cápsula polissacarídica e 4) estabelecer a relação entre o antígeno estafilocócico secretado A e o antígeno imunodominante A;

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBY, S. S. et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–14, 2016.
- BARRETT, J. F.; HOCH, J. A. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1529–1536, 1998.
- BASSO, A. P. et al. Antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus* sp. Isolates from polluted water in southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1813–1820, 2014.
- BATEMAN, A.; RAWLINGS, N. D. **The CHAP domain: A large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases** *Trends in Biochemical Sciences* Elsevier Ltd, , 1 maio 2003.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- CLAUDITZ, A. et al. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4950–4953, 2006.
- COTON, E. et al. Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–3, p. 221–229, 2010.
- DO, T. et al. *Staphylococcus aureus* cell growth and division are regulated by an amidase that trims peptides from uncrosslinked peptidoglycan. **Nature Microbiology**, 2020.
- DUBRAC, S.; MSADEK, T. Identification of Genes Controlled by the Essential YycG/YycF Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1175–1181, 2004.
- FAIRBROTHER, R. W. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 50, n. 1, p. 83–88, 1940.
- FARIÑA, N. et al. Clinically significant coagulase-negative staphylococci: most frequent species and virulence factors. **Revista chilena de infectología**, v. 30, n. 5, p. 480–8, 2013.

- FERREIRA, A. M. et al. 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, n. 3, p. 406–411, 2012.
- FOXMAN, B. Epidemiology of Urinary Tract Infections: Indicence, Morbidity, and Economic Costs. **American Journal of Medicine**, v. 113, n. 1A, p. 5S-13S, 2002.
- GATERMANN, S.; MARRE, R. Cloning and expression of *Staphylococcus saprophyticus* urease gene sequences in *Staphylococcus carnosus* and contribution of the enzyme to virulence. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 10, p. 2998–3002, 1989.
- GLIMAKER, M.; GRANERT, C.; KROOK, A. Septicemia caused by *Staphylococcus saprophyticus*. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 20, p. 347–348, 1988.
- GUIDONI, E. B. M. Infecção urinária na adolescência. v. 77, p. 165–169, 2001.
- HEDMAN, P.; RINGERTZ, O. Urinary tract infections caused by *Staphylococcus saprophyticus*. A matched case control study. **Journal of Infection**, v. 23, n. 2, p. 145–153, 1991.
- HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 109–116, 2003.
- HIGASHIDE, M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying Staphylococcal cassette chromosome mec have emerged in urogenital tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2061–2068, 2008.
- HOLT, D. C. et al. A very early-branching *Staphylococcus aureus* lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin. **Genome Biology and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 881–895, 2011.
- HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect Dis Clin North Am**, v. 11, n. 3, p. 551–581, 1997.
- JELLHEDEN, B.; NORRBY, R. S.; SANDBERG, T. Symptomatic urinary tract infection in women in primary health care. Bacteriological, clinical and diagnostic aspects in relation to host response to infection. **Scand J Prim Health Care**, v. 14, 1996.
- KAHLMETER, G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens

from uncomplicated urinary tract infections: The ECO.SENS project. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 69–76, 2003.

KING, N. P. et al. UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. **Microbiology**, v. 157, n. 4, p. 1161–1175, 2011.

KLEINE, B. et al. 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.

KNOBLOCH, J. K.-M. et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* Depends on Functional RsbU, an Activator of the sigB Operon: Differential Activation Mechanisms Due to Ethanol and Salt Stress. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 8, p. 2624–2633, 15 abr. 2001.

KO, Y. P. et al. Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–13, 2013.

KURODA, M. et al. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13272–7, 2005.

KUSCH, H.; ENGELMANN, S. Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 2, p. 133–141, 2014.

LAMERS, R. P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, 2012.

LANG, S. et al. Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 213–220, 2000.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes and Development**, v. 15, n. 14, p. 1725–1752, 2001.

LIWO, A.; KHALILI, M.; SCHERAGA, H. A. Ab initio simulations of protein-folding

pathways by molecular dynamics with the united-residue model of polypeptide chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2362–2367, 2005.

LOPEZ, R.; GARCIA, E.; RONDA, C. Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 212–223, 1981.

LORENZ, U. et al. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 165–173, 2011.

MALYSZKO, I.; SCHWARZ, S.; HAUSCHILD, T. Detection of a new mecC allotype, mecC2, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 2003–2005, 2014.

MARTIN, P. K. et al. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3666–3673, 1999.

MARTIN, P. K. et al. Novel locus required for expression of high-level macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5810–5813, 2002.

MURRAY, PATRICK R., ROSENTHAL, K. S. *Microbiología Médica*. In: 6. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2009. p. 948.

ORDEN-MARTÍNEZ, B.; MARTÍNEZ-RUIZ, R.; MILLÁN-PÉREZ, R. ¿Qué estamos aprendiendo de *Staphylococcus saprophyticus*? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 8, p. 495–499, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009.

RAZ, R.; COLODNER, R.; KUNIN, C. M. Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 6, p. 896–898, 2005.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 1–11, 2010.

RUPP, M. E.; SOPER, D. E.; ARCHER, G. L. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 2975–2979,

1992.

SAKINC, 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, n. 8, p. 4615–4623, 2006.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Identification and Characterization of an Exotoxin from *Staphylococcus aureus* Associated with Toxic-Shock Syndrome Identification and Characterization of an Exotoxin from *Staphylococcus aureus* Associated with Toxic-Shock Syndrome. v. 143, n. 4, p. 509–516, 2014.

SIBBALD, M. J. J. B. et al. Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 755–788, 2006.

SINGH, V. R.; RAAD, I. Fatal *Staphylococcus saprophyticus* native valve endocarditis in an intravenous drug addict. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 3, p. 783–784, 1990.

SOUSA, V. S. DE et al. *Staphylococcus saprophyticus* recovered from humans, food, and recreational waters in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, 2017.

STAPLETON, M. R. et al. Characterization of IsaA and SceD, two putative lytic transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 20, p. 7316–7325, 2007.

STEPHENSON, K.; HOCH, J. A. Pharmacology and Therapeutics 2002 Stephenson. v. 93, p. 1–13, 2002.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.

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

TJALSMA, H. et al. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 515–547, 2000.

TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 1–9, 2009.

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

WALLMARK, G.; ARREMARK, I.; TELANDER, B. *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. **The Journal of infectious diseases**, v. 138, n. 6, p. 791–797, 1978.

YOUNG, R. Bacteriophage lysis: Mechanism and regulation. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 430–481, 1992.

10. Anexos

10.1- Apresentação em Congresso

Apresentação do trabalho “*CHARACTERIZATION OF SsaA PROTEIN IN Staphylococcus saprophyticus*” durante o 65º Congresso Brasileiro de Genética, realizado de 17 a 20 de setembro de 2019 – Hotel Monte Real Resort – Águas de Lindóia, SP.

Autores: Silva, G. A. A.; Oliveira A. S.; Souza, B. S. V.; Borges, C. L.; Soares, C. M. A.; Marval, M. G.; Parente-Rocha, J. A.

Abstract

Staphylococcus saprophyticus is a Gram-positive bacterium and stands out as the second pathogen responsible for diagnosed cases of urinary tract infection (UTI), affecting mainly young women. Some factors may explain the ability of *Staphylococcus saprophyticus* to colonize periurethral, urinary and genital regions, such as its ability to attach to the epithelial tissue of the genitourinary tract and the high activity of the urease enzyme. However, few mechanisms that this bacterium uses to efficiently infect and colonize the host are fully elucidated. In species of the genus *Staphylococcus* most of the virulence factors are considered as proteins secreted during the process of infection. Our research group identified proteins secreted from *Staphylococcus saprophyticus* isolates that demonstrated a strong ability to stimulate the immune response in mice, one of the major immunogenic proteins identified was the Staphylococcal A Secretory Antigen (SsaA). In other species of the genus *Staphylococcus* the SsaA protein seems to be related to virulence factors being regulated by the same systems, however its specific role during the infection has not yet been fully elucidated. In this sense, we propose the characterization of the SsaA protein in *Staphylococcus saprophyticus*. SsaA is apparently conserved in the genus *Staphylococcus* and has been identified in different strains of *Staphylococcus saprophyticus*, such as food sample (cheese mines), environmental sample (Leblon beach sand) and clinical sample (microbiota of pregnant women) through the technique Western Blotting. Bioinformatics analyzes using the BioCyc database revealed that the SsaA protein has a CHAP domain with a predicted amidase function. The 3D structure of the SsaA protein was predicted through protein modeling by the I-TASSER server following the validation protocols. Cloning, heterologous expression and purification of the SsaA protein are under progress and will contribute to confirm the SsaA function. Our work will contribute to elucidate biological function of SsaA protein, a immunogenic protein that can be useful as diagnostic and/or vaccine target.

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*; SsaA protein; immunogenic proteins.

10.2- Produção científica

Colaboração em artigo científico intitulado “*Staphylococcus saprophyticus* Proteomic Analyses Elucidate Differences in the Protein Repertoires among Clinical Strains Related to Virulence and Persistence” publicado na *Pathogens* em 19 de janeiro de 2020.

Autores: Silva, K. C. S.; Silva, L. O. S.; Silva, G. A. A.; Borges, C. L.; Novaes, E.; Pancez, J. D.; Fontes, W.; Giambiagi-deMarval, M.; Soares, C. M. A.; Parente-Rocha, J. A.

Abstract

Staphylococcus saprophyticus is a Gram-positive and coagulase negative cocci that composes the skin microbiota and can act as an opportunistic agent causing urinary tract infections, being more frequent in sexually active young women. The ability of a pathogen to cause infection in the host is associated to its ability to adhere to host cells and to survive host immune defenses. In this work, we presented the comparative proteomic profile of three *S. saprophyticus* strains. It was possible to characterize differences in the proteome content, specially related to expression of virulence factors. We compiled this data and previous data and we detected one strain (9325) possessing higher production and secretion of proteins related to virulence. Our results show that phenotypic, genotypic, and proteomic differences reflect in the ability to survive during interaction with host cells, since the 9325 strain presented a higher survival rate after macrophage interaction. In counterpart, the 7108 strain that possesses lower content of proteins related to virulence presented higher ability to form biofilm suggesting that this strain can be better adapted to persist in the host and in the environment. Our work describes, for the first time, proteomic flexibility among *S. saprophyticus* strains, reflecting in virulence and persistence.

Keywords: proteome; proteomic flexibility; virulence; urease; thioredoxin; biofilm

10.3- Atividade de extensão

Participação como membro de equipe executora da Ação de Extensão “**Curso de Atualização em Biossegurança**”, coordenado pela professora Juliana Alves Parente Rocha, promovida pelo Instituto de Ciências Biológicas (UFG), em 1 de abril de 2019.