

Hilana Ceotto

Caracterização de peptídeos antimicrobianos com
potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por
Staphylococcus spp.



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Maria do Carmo de Freire Bastos
Coorientadores: Ingolf Nes e Dag Brede

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
AGOSTO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ceotto, Hilana

Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus* spp./ Hilana Ceotto – Rio de Janeiro, 2009

X, 182

Tese de Doutorado em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Maria do Carmo de Freire Bastos

Referências bibliográficas: 216

1. Bacteriocinas 2. Simulancina 3299 3. Aureocina 4181 4. Aureocina 4185 5. *Staphylococcus simulans* 6. *Staphylococcus aureus* 7. Mastite Bovina I. Bastos, Maria do Carmo de Freire. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências Biológicas. III. Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus* spp.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Profa. Maria do Carmo de Freire Bastos, e no Laboratório de Tecnologia de Genes Microbianos da “Norwegian University of Life Sciences”, sob a orientação do Dr. Ingolf Nes e do Dr. Dag Brede.

"A felicidade não está em viver, mas em saber viver. Não vive mais o que mais vive, mas o que melhor vive." - *Mahatma Gandhi*

AGRADECIMENTOS

Este é um espaço especial, tenho muito para agradecer.

Gostaria de agradecer por tudo. Por cada dia vivido. Por cada uma das flores e por cada uma das pedras que encontrei no meu caminho, e por ter tido a chance de entender que algumas flores têm espinhos e que não raro as pedras são valiosas aliadas. Por cada uma das pessoas que de algum modo contribuíram para o caminho que trilhei e para a realização deste trabalho. Pelo privilégio de estar concluindo Doutorado num país onde a educação é sucateada.

À Professora Maria do Carmo de Freire Bastos, pela oportunidade de realizar este trabalho. Pelo seu exemplo profissional como pesquisadora e docente, por tudo que me proporcionou aprender e, acima de tudo, pela sua amizade em todos os momentos.

À Janaína dos Santos Nascimento, pela sua atenção, dedicação e paciência. Pela sua amizade, por estar sempre presente, nos melhores momentos e também nos mais difíceis.

Ao Dr. Ingolf Nes, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, pela sua agradável companhia nas terras geladas da Noruega.

Ao Dr. Dag Brede, pela sua atenção e ajuda para a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Genética Molecular, pela companhia, pela ajuda, pela amizade, pela cumplicidade. Sempre estivemos juntos, mesmo enquanto estava na Noruega: obrigada a todos! Gostaria de agradecer, especialmente, às minhas "filhas" Amina Potter e Karlla Fernanda, que contribuíram especialmente para este trabalho.

A todos do Laboratório de Tecnologia de Genes Microbianos da "Norwegian University of Life Sciences". Ao Zhian Saleihan, pela sua incrível ajuda no laboratório, por ser sempre absolutamente solícito. À Linda Godager, pela recepção e pela ajuda desde a chegada na Noruega. Gostaria de agradecer especialmente aos amigos Morten Kjos, Emma Ludmann e Maria Jönsson.

À minha família, por tudo o que sou, pelo amor, pela compreensão e pelo auxílio durante a realização deste trabalho. Em especial à minha mãe, por todo o carinho, apoio e por todo o investimento de tempo, de sentimentos, de energia e de outras coisinhas mais...

Ao Felipe Vigoder, por tudo. "Entre tantos outros. Entre tantos séculos. Que sorte a nossa hein? Entre tantas paixões, esse encontro, nós dois, esse amor." - Vanessa da Mata.

A todos os amigos. "Um dia você aprende que... verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem tem na vida... aprende que não temos que mudar de amigos, se compreendermos que os amigos mudam..." - William Shakespeare.

A cada uma dessas pessoas pela sua participação em minha vida, pelos momentos que vivemos juntos, pelos sonhos e pelas lembranças que deixaram.

À Dra. Maria Aparecida Vasconcelos de Paiva Brito, por gentilmente ceder as estirpes empregadas neste trabalho.

Ao CNPq, pelas bolsas de Doutorado e de Doutorado Sanduíche, bem como pelo apoio financeiro dado ao laboratório. À FAPERJ, à FUJB e ao PRONEX, pelo apoio financeiro dado ao laboratório.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito." - Chico Xavier.

RESUMO

Hilana Ceotto

Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus* spp.

Orientadora: Maria do Carmo de Freire Bastos

Coorientadores: Ingolf Nes e Dag Brede

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos com atividade inibitória contra outras estirpes bacterianas. Por possuírem um amplo espectro de ação, as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas apresentam um potencial de aplicação biotecnológica. No presente trabalho, três bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp., isolados de mastite bovina, foram purificadas e caracterizadas.

A primeira bacteriocina estudada foi a simulancina 3299. Esta bacteriocina é um lantibiótico de 27 ácidos aminados (2,59 kDa) produzido pela estirpe *S. simulans* 3299, com potencial de aplicação no combate à mastite bovina causada por *Streptococcus agalactiae*. Os genes que codificam esta bacteriocina estão presentes no plasmídeo pRJ97. Eles apresentam uma organização similar àquela encontrada no plasmídeo pPI-1, que codifica a nukacina ISK-1, produzida pela estirpe *S. warneri* ISK-1, exceto pela presença de um elemento de transposição do tipo IS257/431, entre os genes *orf1* e *simA*. A produção da simulancina 3299 foi induzida pela presença de NaCl ou KCl no meio de cultura. Esta bacteriocina apresentou atividade em uma ampla faixa de pH, resistência à ação da temperatura e à ação da proteinase K; entretanto, mostrou-se sensível à ação da tripsina e da protease XXIII.

Doze estirpes de *S. aureus* mostraram-se produtoras de bacteriocinas diferentes das demais estafilococinas já descritas na literatura e sensíveis à ação da temperatura. Dentre elas, as bacteriocinas produzidas pela estirpe *S. aureus* 4185 comportaram-se como bacteriolíticas e foram capazes de inibir estirpes de *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp. envolvidos em infecções nosocomiais, mostrando o potencial de aplicação contra estes microrganismos. A purificação dos peptídeos e a determinação da

sua massa molecular revelaram a presença de cinco componentes distintos. Sequências parciais dos ácidos aminados de alguns peptídeos foram determinadas.

A aureocina 4181 é uma variante da aureocina A70 e os genes que a codificam estão localizados no plasmídeo pRJ80. Esta bacteriocina apresentou atividade contra estirpes clínicas de MRSA e SCN, consideradas resistentes à aureocina A70, e, por isso, ela foi escolhida para ser purificada e caracterizada. A aureocina A70 é produzida pela estirpe *S. aureus* A70, isolada de leite comercial, e sua atividade antimicrobiana resulta da ação sinérgica de quatro peptídeos codificados pelo operon *aurABCD*, localizado no plasmídeo pRJ6. As aureocinas 4181 e A70 apresentaram mecanismos de ação distintos: a estirpe indicadora, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, sofreu lise total pela ação da aureocina 4181, mas sofreu apenas lise parcial pela ação da aureocina A70. A determinação da massa molecular da aureocina 4181 e o sequenciamento dos peptídeos purificados revelaram a presença de quatro componentes (4181A, 4181B, 4181C e 4181D), correspondentes aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD (que compõem a aureocina A70), acrescidos de um grupamento formil. O operon *aurABCD*, codificado pelo plasmídeo pRJ80, é idêntico ao codificado pelo pRJ6 e, portanto, a estrutura primária dos peptídeos 4181A, 4181B, 4181C e 4181D é idêntica à estrutura primária dos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD, sintetizados pela estirpe A70. Outros dois componentes de $3.147,8 \pm 1,5$ Da e $3.179,8 \pm 1,5$ Da foram encontrados nas frações purificadas, sugerindo que a estirpe 4181 possa estar produzindo outras bacteriocinas.

Palavras-chave: bacteriocinas, simulancina 3299, aureocina 4181, aureocina 4185, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus aureus*, mastite bovina

ABSTRACT

Hilana Ceotto

Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus* spp.

Orientadora: Maria do Carmo de Freire Bastos

Coorientadores: Ingolf Nes e Dag Brede

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Bacteriocins are antimicrobial peptides with inhibitory activity against other bacteria. Since the bacteriocins produced by Gram-positive bacteria generally have a broad spectrum of activity, these substances possess potential biotechnological applications. In the present study, three bacteriocins produced by *Staphylococcus* spp., isolated from bovine mastitis, were purified and characterized.

The first bacteriocin studied was simulancin 3299. This bacteriocin is an anti-*Streptococcus agalactiae* lantibiotic of 27 amino acids (2,59 kDa), produced by *S. simulans* 3299, with potential application on mastitis control. The genes involved in simulancin 3299 biosynthesis are located on plasmid pRJ97. They have an organization similar to that found on plasmid pPI-1, which encodes nukacin ISK-1, produced by the strain *S. warneri* ISK-1, except for the presence of an IS257/431 element, between the *orf1* and *simA* genes. Simulancin 3299 production was induced by the addition of NaCl and KCl to the culture medium. This bacteriocin exhibited stability at different pH, resistance to heat and proteinase K, and sensitivity to trypsin and protease XXIII.

Twelve *S. aureus* strains produced bacteriocins that seem to be distinct from the best characterized staphylococcins described so far. These bacteriocins were inactivated by heat. Among them, the bacteriocin produced by strain 4185 may possess potential practical applications, since it exhibited a bacteriolytic activity and was able to inhibit important pathogens such as *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus* spp. isolated from nosocomial infections. Purification and molecular characterization of the peptides produced by strain 4185 revealed the presence of five different components. Partial amino acid sequences of some peptides were determined.

Aureocin 4181 is a variant of aureocin A70, and its gene cluster is found on plasmid pRJ80. This bacteriocin could inhibit MRSA and CNS resistant to aureocin A70 activity and, for this reason, aureocin 4181 was characterized further. Aureocin A70 is a four-peptide bacteriocin produced by *S. aureus* A70, isolated from commercial milk. The *aurABCD* operon and the other genes involved in aureocin A70 production are found on plasmid pRJ6. Aureocin 4181 and aureocin A70 showed different mode of action: the indicator strain, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, was completely lysed by aureocin 4181, but only partially lysed by aureocin A70. The determination of aureocin 4181 molecular mass and its amino acid sequence revealed the presence of four components (4181A, 4181B, 4181C, and 4181D), corresponding to AurA, AurB, AurC, and AurD (aureocin A70 components), with an addition of a formyl group to their N-termini. The *aurABCD* operon, encoded by plasmid pRJ80, is identical to the *aurABCD* operon encoded by plasmid pRJ6. Therefore, the primary structure of 4181A, 4181B, 4181C, and 4181D is identical to the primary structure of AurA, AurB, AurC, and AurD, synthesized by strain A70. Two other components of $3,147.8 \pm 1.5$ Da and $3,179.8 \pm 1.5$ Da were found in the purified fractions, suggesting that strain 4181 may produce other bacteriocins.

Keywords: bacteriocins, simulancin 3299, aureocin 4181, aureocin 4185, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

ÍNDICE

| | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| ABREVIATURAS E SIGLAS | 1 |
| INTRODUÇÃO | 4 |
| 1. Peptídeos Antimicrobianos | 4 |
| 2. Bacteriocinas | 5 |
| 3. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Gram-positivas | 7 |
| 3.1. Lantibióticos | 7 |
| 3.2. Bacteriocinas de classe II | 14 |
| 3.3. Bacteriocinas de classe III | 17 |
| 4. Os <i>Staphylococcus</i> spp. e a produção de bacteriocinas | 17 |
| 4.1. O Gênero <i>Staphylococcus</i> | 17 |
| 4.2. Elementos Genéticos Móveis de <i>Staphylococcus</i> spp. | 23 |
| 4.4. Estafilococcinas | 25 |
| 4.4.1. Estafilococcinas Produzidas por SCN | 25 |
| <i>Pep5</i> | 25 |
| <i>Epicidina 280</i> | 28 |
| <i>Epilancina K7</i> | 29 |
| <i>Epidermina e Suas Variantes</i> | 29 |
| <i>Nukacina ISK-1 e suas variantes</i> | 30 |
| <i>Lisostafina</i> | 33 |
| 4.4.2. Estafilococcinas Produzidas por <i>S. aureus</i> | 35 |
| <i>Estafilococcina C55/BacR1</i> | 35 |
| <i>Aureocina A70</i> | 37 |
| <i>Aureocina A53</i> | 39 |
| 5. Aplicações Biotecnológicas das Bacteriocinas | 41 |
| 5.1. Bacteriocinas como biopreservativos de alimentos | 41 |
| 5.2. Uso de bacteriocinas no tratamento de infecções bacterianas em animais | 45 |
| 5.2.1. Uso de bacteriocinas no tratamento da mastite bovina | 45 |
| 5.3. Uso de bacteriocinas no tratamento de infecções bacterianas em humanos | 47 |
| 5.3. 1. Bacteriocinas como agentes antineoplásicos | 50 |
| 5.4. Uso de bacteriocinas no controle de fitopatógenos | 52 |
| CAPÍTULO I: Purificação e caracterização da simulancina 3299 | 53 |
| JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL | 54 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS | 54 |

| | |
|--|-----------|
| MATERIAIS E MÉTODOS | 56 |
| 1. Estirpes e condições de crescimento | 56 |
| 2. Teste de atividade da simulancina 3299 | 56 |
| 2.1. Teste de difusão em ágar | 56 |
| 2.2. Teste de microdiluição | 56 |
| 3. Cinética de produção da simulancina 3299 | 57 |
| 4. Purificação da simulancina 3299 | 57 |
| 4.1. Obtenção da simulancina 3299 no sobrenadante | 57 |
| 4.2. Cromatografia de interação hidrofóbica | 58 |
| 4.3. Cromatografia de troca catiônica | 58 |
| 4.4. HPLC | 58 |
| 5. Caracterização molecular da simulancina 3299 | 59 |
| 5.1. Determinação da massa molecular | 59 |
| 5.2. Sequenciamento dos ácidos aminados | 59 |
| 6. Cinética de atividade da simulancina 3299 | 59 |
| 7. Determinação das condições ótimas de atividade da simulancina 3299 | 60 |
| 7.1. Determinação da sensibilidade a enzimas proteolíticas | 60 |
| 7.2. Ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299 | 61 |
| 7.3. Ação do pH sobre a estabilidade da simulancina 3299 | 61 |
| 8. Efeito da concentração de sais sobre a produção da simulancina 3299 | 61 |
| 8.1. Cinética de crescimento da estirpe <i>S. simulans</i> 3299 | 61 |
| 8.2. Contagem das células viáveis | 61 |
| 8.3. Análise da produção da simulancina 3299 | 61 |
| 8.4. Análises estatísticas | 62 |
| 9. Obtenção de DNA plasmidial | 62 |
| 9.1. Isolamento de DNA plasmidial | 62 |
| 9.2. Eletroforese em gel de agarose | 62 |
| 9.3. Purificação do DNA plasmidial a partir do gel de agarose | 63 |
| 10. Isolamento de DNA genômico | 63 |
| 11. PCR | 63 |
| 12. Quantificação de ácidos nucleicos | 64 |
| 13. Clonagem | 64 |
| 13.1. Purificação dos amplicons | 64 |
| 13.2. Ligação | 64 |
| 13.3. Preparo das células competentes de <i>E. coli</i> DH5  | 64 |
| 13.4. Transforma o das células competentes de <i>E. coli</i> DH5  com os produtos amplificados ligados ao vetor pGEM-T Easy | 65 |
| 13.5. Análise dos transformantes obtidos | 65 |

| | |
|---|------------|
| 14. Sequenciamento do fragmento clonado | 65 |
| 15. Análises <i>in silico</i> das sequências de DNA | 65 |
| 16. Análise da transcrição do gene estrutural da simulancina 3299 | 66 |
| 16.1. Obtenção de RNA | 66 |
| 16.2. Síntese do cDNA | 67 |
| 16.3. RT-PCR | 67 |
| RESULTADOS | 68 |
| 1. Cinética de produção da simulancina 3299 | 68 |
| 2. Purificação e caracterização molecular da simulancina 3299 | 68 |
| 3. Identificação do gene estrutural da simulancina 3299 | 70 |
| 4. Localização dos determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299 | 70 |
| 5. Organização genética relativa à simulancina 3299 | 73 |
| 5.1. Clonagem e sequenciamento de DNA | 73 |
| 5.2. Análises <i>in silico</i> | 78 |
| 6. Análise da transcrição do gene estrutural da simulancina 3299 | 83 |
| 7. Cinética de atividade da simulancina 3299 | 83 |
| 8. Determinação das propriedades da simulancina 3299 | 83 |
| 8.1. Ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299 | 83 |
| 8.2. Ação do pH sobre a atividade da simulancina 3299 | 86 |
| 8.3. Determinação da sensibilidade da simulancina 3299 a enzimas proteolíticas | 86 |
| 9. Análise da influência de sais na produção da simulancina 3299 | 86 |
| 9.1. Efeito do NaCl sobre a produção da simulancina 3299 | 88 |
| 9.2. Efeito do KCl sobre a produção da simulancina 3299 | 90 |
| 9.3. Efeito do CaCl ₂ sobre a produção da simulancina 3299 | 91 |
| DISCUSSÃO | 92 |
| CONCLUSÕES | 99 |
| PERSPECTIVAS FUTURAS | 100 |
| CAPÍTULO II: Produção de bacteriocinas por <i>S. aureus</i> envolvidos em mastite bovina na região Sudeste do Brasil | 101 |
| JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL | 102 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS | 102 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 104 |
| 1. Estirpes e condições de crescimento | 104 |
| 2. Ação da temperatura sobre a atividade das bacteriocinas produzidas por <i>S. aureus</i> | 104 |
| 3. Determinação do espectro de ação das bacteriocinas | 104 |
| 4. Cinética de produção da(s) bacteriocina(s) sintetizada(s) pela estirpe 4185 | 107 |

| | |
|---|-----|
| 5. Purificação da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 | 107 |
| 5.1 Obtenção da(s) bacteriocina(s) no sobrenadante | 107 |
| 5.2. Precipitação com sulfato de amônio | 107 |
| 5.3. Cromatografia de troca catiônica | 107 |
| 5.4. HPLC | 107 |
| 6. Caracterização molecular da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 | 108 |
| 6.1. Determinação da massa molecular | 108 |
| 6.2. Sequenciamento dos ácidos aminados | 108 |
| 7. Cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 | 108 |
| 8. Digestão de DNA genômico | 108 |
| 9. Detecção dos genes <i>pepA</i> , <i>epiA</i> , <i>elkA</i> , <i>eciA</i> , e <i>simA</i> por PCR | 108 |
| 10. Detecção dos genes <i>pepA</i> , <i>epiA</i> , <i>elkA</i> , <i>eciA</i> , e <i>simA</i> por hibridação DNA/DNA | 109 |
| RESULTADOS | 112 |
| 1. Detecção dos genes estruturais de estafilococcinas: <i>pepA</i> , <i>eciA</i> , <i>elkA</i> , <i>epiA</i> e <i>simA</i> | 112 |
| 2. Sensibilidade à temperatura | 112 |
| 3. Espectro de ação das estafilococcinas | 112 |
| 4. Cinética de produção da(s) bacteriocina(s) pela estirpe 4185 | 115 |
| 5. Purificação da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 | 115 |
| 6. Caracterização molecular da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 | 117 |
| 7. Cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 | 122 |
| DISCUSSÃO | 124 |
| CONCLUSÕES | 129 |
| PERSPECTIVAS FUTURAS | 130 |
| CAPÍTULO III: Purificação e caracterização da aureocina 4181 | 131 |
| JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL | 132 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS | 132 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 134 |
| 1. Estirpes e condições de crescimento | 134 |
| 2. Determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 | 134 |
| 2.1. Determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 em meio sólido | 134 |
| 2.2. Determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 através de microdiluição | 135 |
| 3. Cinética de produção da aureocina 4181 | 135 |
| 4. Cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70 | 135 |

| | |
|--|-----|
| 5. Purificação da aureocina 4181 | 135 |
| 6. Caracterização molecular da aureocina 4181 | 135 |
| 7. Comparação da sequência do operon <i>aurABCD</i> , presente nos plasmídeos pRJ80 e pRJ6 | 136 |
| 7.1. Amplificação do operon <i>aurABCD</i> presente no plasmídeo pRJ80 | 136 |
| 7.2. Clonagem do operon <i>aurABCD</i> | 136 |
| 7.3. Análise dos transformantes obtidos | 136 |
| 7.4. Sequenciamento do operon <i>aurABCD</i> | 136 |
| 7.5. Análises, <i>in silico</i> , da sequência do operon <i>aurABCD</i> | 136 |
| 8. Comparação dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6 | 137 |
| 8.1. Análises, <i>in silico</i> , do plasmídeo pRJ6 | 137 |
| 8.2. Digestão do DNA plasmidial | 137 |
| 8.3. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos pRJ6 e pRJ80 digeridos | 137 |
| 8.4. Hibridação DNA/DNA | 137 |
| RESULTADOS | 139 |
| 1. Comparação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 | 139 |
| 2. Cinética de produção da aureocina 4181 | 139 |
| 3. Comparação da cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70 | 142 |
| 4. Purificação da aureocina 4181 | 142 |
| 5. Caracterização molecular da aureocina 4181 | 145 |
| 6. Sequenciamento do operon <i>aurABCD</i> | 148 |
| 7. Comparação dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6 | 148 |
| DISCUSSÃO | 153 |
| CONCLUSÕES | 158 |
| PERSPECTIVAS FUTURAS | 159 |
| BIBLIOGRAFIA | 160 |

LISTA DE FIGURAS

| | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| FIGURA 1: Síntese da Lan e da MeLan. | 10 |
| FIGURA 2: Modo de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas. | 13 |
| FIGURA 3: Produção das bacteriocinas da subclasse IIa: sistema regulatório de três componentes, síntese, processamento, excreção e imunidade. | 16 |
| FIGURA 4. Modelo da biossíntese de PIA. | 22 |
| FIGURA 5: Representação esquemática dos genes envolvidos na biossíntese de lantibióticos produzidos por <i>Staphylococcus</i> spp. | 26 |
| FIGURA 6: Representação esquemática da estrutura dos lantibióticos produzidos por SCN: Pep5, epicidina 280, epilancina K7, epidermina e nukacina ISK-1. | 27 |
| FIGURA 7: Estrutura da lisostafina. | 34 |
| FIGURA 8: Representação esquemática dos genes envolvidos na biossíntese das aureocinas A70 e A53, produzidas por <i>S. aureus</i> . | 38 |
| FIGURA 9: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a adesão da estirpe <i>Corynebacterium</i> spp. 633544 a cateteres de silicone. | 51 |
| FIGURA 10: Cinética de produção da simulancina 3299 nos meios BHI e GM17. | 69 |
| FIGURA 11: Purificação e caracterização molecular da simulancina 3299. | 71 |
| FIGURA 12: Detecção do gene <i>nukA</i> por PCR. | 72 |
| FIGURA13: Localização dos determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299 por PCR. | 75 |
| FIGURA 14: Organização genética relativa à simulancina 3299, analisada por PCR. | 76 |
| FIGURA 15: Sequência nucleotídica do fragmento contendo a região entre os genes <i>orf1</i> e <i>simA</i> , presente no plasmídeo pRJ97. | 79 |
| FIGURA 16: IS257 encontrada na região entre os genes <i>orf1</i> e <i>simA</i> , do plasmídeo pRJ97, da estirpe <i>S. simulans</i> 3299. | 80 |
| FIGURA17: Representação das organizações genéticas relativas à simulancina 3299 e à nukacina ISK-1. | 81 |
| FIGURA 18: Alinhamento das sequências da região intergênica entre os genes <i>orf1</i> e <i>nukA/simA</i> . | 82 |
| FIGURA 19: Detecção da transcrição do gene <i>simA</i> . | 84 |
| FIGURA 20: Cinética de atividade da simulancina 3299. | 85 |
| FIGURA 21: Cinética de crescimento da estirpe <i>S. simulans</i> 3299 sob condições | |

| | |
|--|-----|
| diversas. | 87 |
| FIGURA 22: Alinhamento das sequências dos pré-peptídeos da nukacina KQU-131, nukacina ISK-1, que é idêntica à simulancina 3299, e lacticina 481. | 97 |
| FIGURA 23: Detecção dos genes <i>epiA</i> e <i>eciA</i> por PCR. | 113 |
| FIGURA 24: Sensibilidade das bacteriocinas produzidas por <i>S. aureus</i> à ação da temperatura. | 114 |
| FIGURA 25: Cinética de produção de bacteriocina(s) pela estirpe 4185. | 116 |
| FIGURA 26: Eluição da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 com 40% de isopropanol. | 118 |
| FIGURA 27: Eluição da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 com 80% de isopropanol. | 119 |
| FIGURA 28: Análise da massa molecular da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185. | 120 |
| FIGURA 29: Cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 contra <i>M. luteus</i> ATCC 4698. | 123 |
| FIGURA 30: Inibição de <i>S. aureus</i> 69 Hp pelas estirpes <i>S. aureus</i> A70 e <i>S. aureus</i> 4181. | 140 |
| FIGURA 31: Cinética de produção da aureocina 4181 nos meios BHI e GM17. | 141 |
| FIGURA 32: Cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70 contra <i>M. luteus</i> ATCC 4698. | 143 |
| FIGURA 33: Purificação da aureocina 4181 através de HPLC. | 144 |
| FIGURA 34: Análise da massa molecular da aureocina 4181. | 146 |
| FIGURA 35: Alinhamento das sequências da fita anticodificadora do operon <i>aurABCD</i> , presente nos plasmídeos pRJ80 e pRJ6. | 149 |
| FIGURA 36: Digestão dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6 com a enzima <i>ClaI</i> . | 151 |
| FIGURA 37: Comparação dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6. | 152 |

LISTA DE TABELAS

| | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| TABELA 1: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas. | 8 |
| TABELA 2: Principais fatores de virulência de <i>S. aureus</i> . | 19 |
| TABELA 3: Espectro de atividade de estafilococinas produzidas por <i>S. aureus</i> . | 42 |
| TABELA 4: Espectro de atividade de estafilococinas produzidas por SCN. | 43 |
| TABELA 5: Oligonucleotídeos iniciadores empregados para a detecção dos genes <i>nuk</i> . | 74 |
| TABELA 6: Análise da organização genética da simulancina 3299, por PCR. | 77 |
| TABELA 7: Efeito do NaCl, KCl e CaCl ₂ sobre a produção da simulancina 3299. | 89 |
| TABELA 8: Estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de mastite bovina. | 105 |
| TABELA 9: Outras estirpes bacterianas empregadas neste trabalho. | 106 |
| TABELA 10: Oligonucleotídeos iniciadores empregados para a detecção dos genes <i>pepA</i> , <i>eciA</i> , <i>elkA</i> , <i>epiA</i> e <i>nukA</i> . | 110 |
| TABELA 11: Caracterização molecular das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185. | 121 |
| TABELA 12: Comparação do espectro de ação das aureocinas A70 e 4181, através de testes realizados em placas de microdiluição. | 140 |
| TABELA 13: Peptídeos componentes das aureocinas 4181 e A70. | 147 |
| TABELA 14: Comparação de sítios de restrição encontrados nos plasmídeos pRJ80 e pRJ6. | 150 |

ABREVIATURAS E SIGLAS

Aap - “accumulation-associated protein” (proteína associada à acumulação)
ABC - “ATP-binding cassette” (cassete de ligação ao ATP)
Ala, A - alanina
Ap - ampicilina
Asn, N - asparagina
Asp, D - ácido aspártico
Arg, R - arginina
ATCC - “American Type Culture Collection”
AtlE - autolisina E
Bac - bacteriocina (s) ou bacteriocinogênico (s), (a), (as)
Bap - “biofilm associated protein” (proteína associada ao biofilme)
BHI - “brain heart infusion” - infusão de cérebro e coração
CA-MRSA - “community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”
(*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquiridos na comunidade)
Ce - cefalotina
ClfA - “clumping factor A” (fator de agregação A)
Cl - clindamicina
Co - cloranfenicol
Cp - ciprofloxacina
Cys, C - cisteína
Da - dalton (s)
D-Ala - D-alanina
Dha - dideidroalanina
Dhb - dideidrobutirina
DO - densidade óptica
EDTA - etileno-diamino-tetracetato
Em - eritromicina
ETA - toxina esfoliativa A
ETB - toxina esfoliativa B
ETE- toxina emética
EtBr - brometo de etídeo
Fbe - “fibrinogen binding protein of *S. epidermidis*” (proteína de ligação ao fibrinogênio de *S. epidermidis*)
FDA - “Food and Drug Administration”
FMN - flavina-mononucleotídeo
g - força gravitacional
Gln, Q - glutamina
Glu, E - ácido glutâmico
Gly, G - glicina
Gm - gentamicina
GRAS - “Generally Recognized As Safe” (geralmente reconhecido como seguro)
Hbl - hemolisina BL
His, H - histidina
HPLC - “High Performance Liquid Chromatography” (cromatografia líquida de alta performance)
Ile, I - isoleucina

IPTG - "isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside" (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo)
IS - sequência de inserção
kb - quilobase (s), 1.000 pb
kDa - quilodalton (s), 1.000 Da
Lan - lantionina
LB - Luria-Bertani
Leu, L - leucina
Lys, K – lisina
MALDI-TOF - "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization" (Dessorção/ Ionização de Matriz Assistida por Laser)
MeLan - β -metil-lantionina
Met, M - metionina
MRS - "Man, Rogosa & Sharpe"
MRSA - "methicillin resistant *Staphylococcus aureus*" (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina)
NCBI - "National Center for Biotechnology Information"
Nhe - enterotoxina não-hemolítica
ORF - "open reading frame" (quadro de leitura aberto)
pb - par (es) de base (s)
PBP - "penicillin-binding protein" (proteína ligante de penicilina)
Pc - penicilina
PCR - "polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase)
Phe, F - fenilalanina
pI - ponto isoelétrico
PIA - "polysaccharide intercellular adhesin" (polissacarídeo de adesão intercelular)
PNSG - poli-N-succinil β -1,6-glicosamina
Pro, P - prolina
p/v - peso por volume
RBS - "ribosome binding site" (sítio de ligação ao ribossomo)
rpm - revoluções por minuto
RT-PCR - "reverse transcription-polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa)
SasG - "*S. aureus* surface protein G" (proteína G de superfície de *S. aureus*)
SAM - substância (s) antimicrobiana (s)
SCC *mec* - "staphylococcal cassette chromosome *mec*" (cassete *mec* do cromossomo estafilocócico)
SCN - *Staphylococcus* coagulase-negativos
SCP - *Staphylococcus* coagulase-positivos
SDS - dodecil sulfato de sódio
SEA - enterotoxina estafilocócica A
SEB - enterotoxina estafilocócica B
SEC - enterotoxina estafilocócica C
SED - enterotoxina estafilocócica D
SEE - enterotoxina estafilocócica E
SEG - enterotoxina estafilocócica G
SEH - enterotoxina estafilocócica H
SEI - enterotoxina estafilocócica I
Ser, S - serina
SSC - Salina/ citrato de sódio

TAE - Tris/acetato/EDTA
Tc - tetraciclina
TE - Tris/EDTA
TFA - ácido trifluoracético
Thr, T - treonina
Tm - temperatura de desnaturação média
Tris - Tris (hidroxi-metil-amino-metano)
Trp, W - triptofano
TSB - "tryptone soy broth" (caldo de triptona e soja)
TSST-1 - "toxic shock syndrome toxin 1" (toxina da síndrome do choque tóxico 1)
Tyr, Y - tirosina
UB - unidade(s) de bacteriocina(s)
UFC - unidades formadoras de colônia
Val, V - valina
v/v - volume por volume
X-Gal - "5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside" (5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo)

INTRODUÇÃO

1. Peptídeos Antimicrobianos

Muitos peptídeos antimicrobianos são substâncias sintetizadas via ribossomo, amplamente disseminadas na natureza, sendo produzidas tanto por eucariotos como por procariotos (BASTOS *et al.*, 2009). Embora eles formem um grupo diverso de peptídeos, a julgar pelos seus variados tamanhos e pelas suas estruturas primárias, geralmente, os peptídeos antimicrobianos são catiônicos e anfipáticos (PESCHEL & SAHL, 2006).

Nos vertebrados, os peptídeos antimicrobianos representam a primeira linha de um sistema sofisticado de defesa, agindo diretamente sobre os microrganismos. Entre insetos e plantas, esses peptídeos são as principais moléculas efetoras no combate às infecções. Os peptídeos antimicrobianos produzidos por microrganismos atuam como antagonistas aos seus competidores (SAHL *et al.*, 2005).

As defensinas compõem a principal classe de peptídeos antimicrobianos produzidos pelos vertebrados. Nos mamíferos, as defensinas são expressas principalmente em fagócitos e na mucosa das células epiteliais. Elas são sintetizadas na forma de um pré-peptídeo, com aproximadamente 95 resíduos de ácidos aminados, incluindo uma sequência-sinal no seu terminal amino, de 19 ácidos aminados. Esses peptídeos são ricos em Cys, apresentam aproximadamente 4 kDa e estão agrupados em famílias, com base nas suas diferenças estruturais: defensinas α ou defensinas β . Estas duas famílias diferem no número de resíduos de ácidos aminados (as defensinas α apresentam de 29-35 resíduos, enquanto as defensinas β apresentam 38-42 resíduos), bem como na sua estrutura secundária (PAPAGIANNI, 2003).

A pele dos anfíbios também é rica em peptídeos antimicrobianos, que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, protozoários e vírus (JENSSEN, HAMILL, & HANCOCK, 2006), sendo as magaininas o principal grupo estudado. Elas são sintetizadas na forma de poliproteínas contendo diversos segmentos, que são clivadas originando os peptídeos maduros. Estes peptídeos apresentam entre 21 e 27 resíduos de ácidos aminados e apresentam estrutura helicoidal (PAPAGIANNI, 2003).

Os invertebrados não apresentam um sistema imunológico comparável ao sistema imune adaptativo dos mamíferos, possuindo apenas um sistema imune inato que os protege contra a invasão de patógenos. Considerando o extraordinário sucesso evolutivo deste grupo, é evidente que o seu sistema imune inato é extremamente eficiente. Dentre outros fatores, a produção de peptídeos antimicrobianos tem sido relacionada com a proteção destes organismos contra infecções. Dentre os peptídeos antimicrobianos produzidos por insetos, estão as cecropinas e as defensinas. As cecropinas são peptídeos com 31-39 resíduos de ácidos aminados, apresentam uma conformação em hélice α e têm sido

frequentemente encontradas na hemolinfa de lepidópteros e dípteros. As defensas encontradas nos insetos são similares às aquelas produzidas por mamíferos, com 38-43 resíduos de ácidos aminados (JENSSEN, HAMILL & HANCOCK, 2006).

Os fungos também sintetizam peptídeos, via ribossomo, com estrutura e atividade antimicrobiana similares às das defensas. A plectasina foi a primeira defesa fúngica isolada e apresenta atividade contra *Streptococcus pneumoniae* resistentes a antibióticos (SANG & BLECHA, 2008).

Assim como os demais organismos eucarióticos, os vegetais também se encontram constantemente expostos a organismos patogênicos e a sua sobrevivência demanda respostas rápidas contra essas infecções, que incluem a síntese de defensas e tioninas. As defensas produzidas pelas plantas também são similares às aquelas produzidas por mamíferos e insetos. Elas apresentam massa molecular entre 5 e 7 kDa, apresentam oito resíduos conservados de Cys, mas a sua estrutura é globular (CARVALHO & GOMES, 2009). As tioninas são peptídeos menores do que 5 kDa, também ricos em Cys, e com atividade citotóxica contra diferentes tipos celulares (STEC, 2006).

Uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos é sintetizada por bactérias, as bacteriocinas (RILEY & CHAVAN, 2007).

2. Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos com atividade inibitória contra outras estirpes bacterianas. Essas substâncias são produzidas por arqueas, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (RILEY & CHAVAN, 2007).

Em geral, as bacteriocinas são muito mais potentes do que os peptídeos antimicrobianos produzidos por eucariotos. Enquanto os peptídeos antimicrobianos de eucariotos são ativos em concentração micromolar, as bacteriocinas agem, geralmente, em concentração nanomolar (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

As estirpes bacteriocinogênicas são imunes às suas próprias bacteriocinas e esta imunidade pode ser conferida por uma proteína expressa concomitantemente com a bacteriocina, ou por um sistema de imunidade. Os genes que codificam as proteínas de imunidade têm sido encontrados próximos ou a jusante dos genes estruturais das bacteriocinas (JACK, TAGG & RAY, 1995).

Geralmente, as bacteriocinas são codificadas na forma de um pré-peptídeo que é processado após a sua tradução, através da clivagem de um peptídeo-líder, para a sua forma biologicamente ativa. Os genes envolvidos em funções auxiliares à biossíntese das bacteriocinas, como os genes envolvidos no processamento do pré-peptídeo, na regulação da expressão da bacteriocina e também na sua translocação para o meio extracelular, também são encontrados próximos ao gene estrutural (JACK, TAGG & RAY, 1995).

Uma única estirpe bacteriana pode produzir mais de uma bacteriocina, como é o caso da estirpe *Carnobacterium piscicola* LV17B que produz as bacteriocinas carnobacteriocinas A, BM1 e B2, cujos genes estão localizados em um plasmídeo de 72 kb, no cromossomo e em um plasmídeo de 61 kb, respectivamente (QUADRI *et al.*, 1994; QUADRI *et al.*, 1997).

As bactérias Gram-negativas produzem duas classes principais de bacteriocinas: as colicinas e as microcinas (GORDON, OLIVER & LITTLEFIELD-WYER, 2007).

A primeira colicina foi identificada por Gratia, em 1925, como um produto termolábil produzido pela estirpe *Escherichia coli* V, com ação antagonística contra *E. coli* ϕ . Desde então, diferentes bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas têm sido identificadas (CASCALES *et al.*, 2007).

As colicinas são proteínas alongadas, com massa molecular entre 25 e 80 kDa e estão organizadas em três domínios: o domínio N-terminal está relacionado com a sua translocação através da membrana celular; o domínio central é relacionado com a ligação da bacteriocina ao receptor da célula sensível e o domínio C-terminal apresenta a porção biologicamente ativa da bacteriocina. Os genes envolvidos na sua produção estão codificados em plasmídeos colicinogênicos (pCol) e geralmente compreendem um gene estrutural, um gene que codifica a proteína de imunidade e um gene de lise, que codifica uma proteína envolvida em exportar a colicina, através da lise da célula produtora. Portanto, a síntese dessas bacteriocinas é letal para a célula que a produz (CASCALES *et al.*, 2007).

Existem duas classes de pCol. Os pCol do tipo I são plasmídeos pequenos, entre 6 e 10 kb, presentes em aproximadamente 20 cópias por célula, e mobilizáveis na presença de plasmídeos conjugativos. Já os pCol do tipo II são plasmídeos maiores, de aproximadamente 40 kb, que estão presentes em uma única cópia por célula, além de serem conjugativos. A produção das colicinas é mediada pelo sistema SOS bacteriano e ocorre principalmente sob condições de estresse (CASCALES *et al.*, 2007).

Já as microcinas são peptídeos de baixo peso molecular (<10 kDa), altamente hidrofóbicos, termorresistentes e estáveis em uma ampla faixa de pH extremo. Estes peptídeos apresentam organização genética conservada, mas suas estruturas primárias são muito diversificadas, o que dificulta a sua classificação. Algumas microcinas podem sofrer modificações pós-tradução, como é o caso da MccC, de 1.178 Da (METLITSKAYA *et al.*, 2009).

Dentre as bacteriocinas produzidas pelas arqueas, as arqueocinas, apenas as halocinas (produzidas por halobactérias) já foram caracterizadas. Isso se deve ao fato de que essa família de peptídeos só começou a ser estudada na década de 1980. Esses peptídeos podem apresentar diferentes tamanhos e são designados micro-halocinas, quando menores do que 10 kDa. Eles, geralmente, são termossensíveis, ativos apenas na presença de sais (em concentrações superiores a 5%) e estão codificados em

megaplasmídeos. As halocinas descritas apresentam um limitado espectro de atividade, exclusivamente contra bactérias relacionadas às estirpes produtoras (SHAND & LEYVA, 2007).

Embora as primeiras bacteriocinas caracterizadas tenham sido isoladas de bactérias Gram-negativas, desde a descoberta da nisina (uma bacteriocina com importante aplicação industrial), um grande número de peptídeos com atividade antimicrobiana, produzidos por bactérias Gram-positivas, em especial as do ácido láctico, tem sido investigado e caracterizado (NES *et al.*, 1996; COTTER, HILL & ROSS, 2005; HENG *et al.*, 2007).

3. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Gram-positivas

Diferenças estruturais e funcionais entre as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas justificam a separação dessas substâncias em algumas classes. Atualmente, três diferentes classes estão estabelecidas, segundo aspectos estruturais e de atividade, com base em estudos sobre as bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico: classe I ou lantibióticos, classe II e classe III, apresentadas na TABELA 1 (COTTER, HILL & ROSS, 2005; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

As bacteriocinas das classes I e II são as mais estudadas e, conseqüentemente, com o modo de ação melhor elucidado, por serem as mais abundantes e por apresentarem um maior potencial de emprego industrial (BIERBAUM & SAHL, 2009; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

3.1. Lantibióticos

Os lantibióticos (antibióticos contendo lantionina) formam um grupo de peptídeos pequenos (menores do que 5 kDa) contendo ácidos aminados pouco comuns, especialmente lantionina (Lan) e β -metil-lantionina (MeLan). Mais de 60 lantibióticos já foram descritos. Todos são produzidos por bactérias Gram-positivas e apresentam atividade contra bactérias deste mesmo grupo (BIERBAUM & SAHL, 2009).

De acordo com Bierbaum & Sahl (2009), os eventos associados à produção de um lantibiótico incluem: a formação do pré-lantibiótico, as modificações pós-tradução (desidratação e reações de ligações cruzadas entre os ácidos aminados), a clivagem da sequência-líder e a secreção do peptídeo maduro para o meio extracelular. Adicionalmente, a célula produtora deve ser imune ao lantibiótico produzido.

TABELA 1: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.

| Classificação | Características | Subclasses | Exemplos (Referências) |
|-----------------------------|---|--|--|
| Classe I (lantibióticos) | Peptídeos pequenos (< 5 kDa) contendo ácidos aminados pouco comuns, como lantionina e β-metil-lantionina, e ácidos aminados desidratados após a tradução, como dideidroalanina e dideidrobutirina | Tipo A: flexíveis e alongados e que atuam sobre a membrana plasmática Tipo B: peptídeos com estrutura globular e que atuam por inibição enzimática da biossíntese da parede celular Tipo C: lantibióticos de dois componentes Tipo D: atividade antimicrobiana reduzida, ou sem atividade bactericida | Nukacina ISK-1 (SASHIHARA <i>et al.</i> , 2000) Mersacidina (BIERBAUM & SAHL, 2009) Estafilococcina C55 (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998) SapT (BIERBAUM & SAHL, 2009) |
| Classe II | Peptídeos pequenos (< 10 kDa), que não apresentam ácidos aminados modificados | Ila: peptídeos do tipo pediocina Ilb: complexo formado por dois peptídeos Ilc: bacteriocinas cíclicas Ild: bacteriocinas compostas por um único peptídeo, que não sofre modificações após a tradução, e que não é do tipo pediocina Ile: complexos compostos por três ou mais peptídeos | Pediocina PA-1 (MARUGG <i>et al.</i> , 1992) Lactococcina G (NISSEN-MEYER <i>et al.</i> , 1992) Enterocina AS-48 (MAQUEDA <i>et al.</i> , 2008) Aureocina A53 (NETZ <i>et al.</i> , 2002) Aureocina A70 (NETZ <i>et al.</i> , 2001) |
| Classe III | Peptídeos maiores do que 10 kDa e geralmente termolábeis | Illa: bacteriolisinas IIIb: bacteriocinas não líticas | Lisostafina (BASTOS <i>et al.</i> , 2009) Helveticina J (THOMPSON, COLLINS & MERCER, 1996) |

Adaptado de Heng *et al.* (2007), Bierbaum & Sahl (2009) e Nissen-Meyer *et al.* (2009).

Atualmente, aceita-se uma nomenclatura genérica para todas as funções envolvidas na síntese dos lantibióticos, incluindo o peptídeo precursor (LanA); as enzimas responsáveis pelas reações de modificação da molécula (LanB e LanC, ou LanM); as proteínas acessórias, como a protease responsável pela remoção do peptídeo-líder (LanP); o transportador do tipo ABC (“ATP-binding cassette”, cassete de ligação ao ATP) - envolvido na translocação do peptídeo (LanT); proteínas reguladoras (LanR, LanK) e as proteínas dedicadas à imunidade da célula contra a bacteriocina produzida (LanI, LanH e LanFEG).

O gene estrutural, *lanA*, é encontrado em todos os lantibióticos e codifica um pré-peptídeo, inativo dentro da célula produtora. Esse pré-lantibiótico carrega uma região N-terminal, ou sequência-líder, que é geralmente clivada antes da sua exportação para o meio extracelular (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; BIERBAUM & SAHL, 2009).

Além de Lan e MeLan, outros ácidos aminados pouco comuns são encontrados nos lantibióticos: dideidroalanina (Dha), dideidrobutirina (Dhb), D-alanina (D-Ala), lisinoalanina e oxobutiril, dentre outros, em um total de 17 ácidos aminados pouco comuns. Esses ácidos aminados incomuns são sintetizados a partir de modificações pós-tradução sofridas pelos lantibióticos. Tais modificações envolvem, geralmente, três ácidos aminados (Ser, Thr e Cys), embora Lys, Asn e Ile também possam ser encontradas na sua forma modificada. A desidratação da Ser leva à formação de Dha, enquanto que a desidratação da Thr leva à formação de Dhb. Lan e MeLan são formadas pela adição de grupos tiol da Cys próxima a estes ácidos aminados desidratados, que gera pontes tioéteres entre eles. Como consequência da presença destas ligações intramoleculares, os lantibióticos são estruturas policíclicas contendo anéis de Lan e MeLan. Estas modificações são catalizadas pelas enzimas LanB (desidratase), responsável pelas reações de desidratação do pré-peptídeo, e LanC (ciclase), responsável pela formação dos anéis tioéteres (FIGURA 1). Alternativamente, essas duas reações podem ser catalisadas pela proteína bifuncional LanM, naqueles lantibióticos que não apresentam LanB e LanC (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; BASTOS *et al.*, 2009; BIERBAUM & SAHL, 2009).

A conformação policíclica dos lantibióticos parece conferir a esses peptídeos rigidez e resistência à ação do calor, assim como contribui para a sua atividade antimicrobiana (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; BASTOS *et al.*, 2009; BIERBAUM & SAHL, 2009).

Para que os lantibióticos possam exercer a sua atividade antibacteriana, a sequência-líder presente no seu terminal amino precisa ser clivada. Em alguns lantibióticos, a clivagem proteolítica do peptídeo-líder é catalisada por serina-proteases (LanP), antes ou durante a exportação do peptídeo. Dentre esses lantibióticos, a exportação do pré-peptídeo é realizada por LanT, que possui exclusivamente esta função (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; COTTER, HILL & ROSS, 2005).

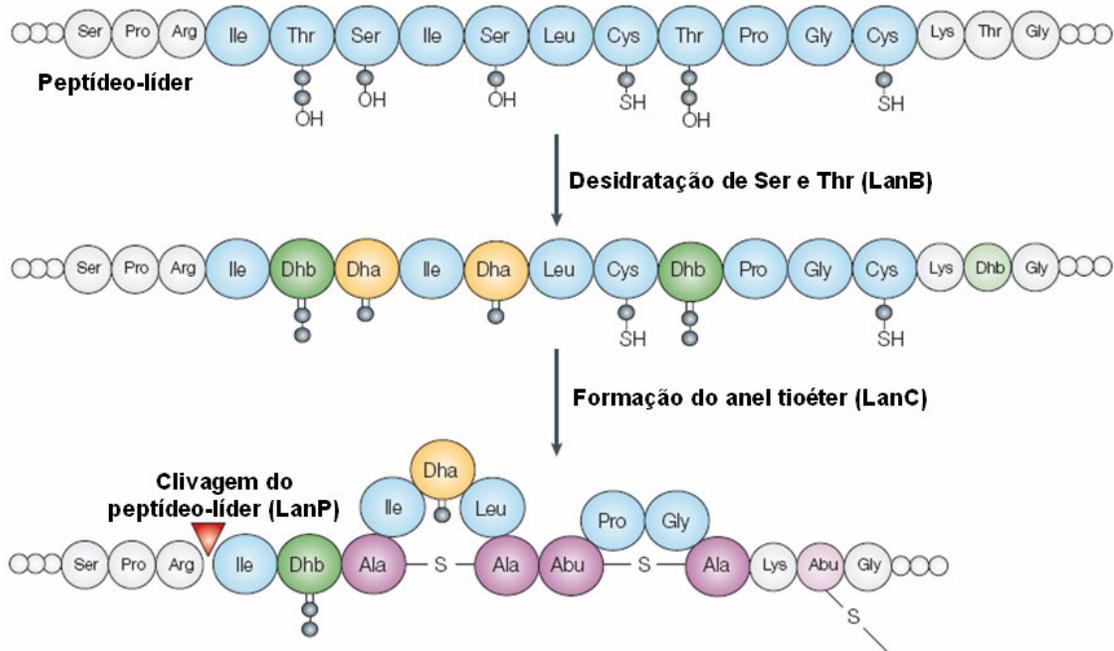


FIGURA 1: Síntese da Lan e da MeLan. Lan e MeLan são formadas pela desidratação dos resíduos de Ser e de Thr, gerando Dha e Dhb, respectivamente, pela ação de LanB. A adição de grupos tiol da Cys próxima a estes ácidos aminados desidratados gera pontes tioéteres entre eles, formando Lan e MeLan, pela ação de LanC. Em alguns lantibióticos, a clivagem proteolítica do peptídeo-líder é catalisada por LanP, antes ou durante a exportação do peptídeo (adaptado de COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Nos lantibióticos que apresentam sítios de clivagem do tipo glicina-dupla, a clivagem da sequência-líder é efetuada concomitantemente à exportação do peptídeo. Neste caso, ambos os eventos são realizados por LanT. Os transportadores LanT que realizam essas duas funções contêm, além dos domínios transmembrana e de ligação ao ATP, um domínio proteolítico adicional no seu terminal amino, que atua como um membro da família das cisteína-proteases. Este domínio se localiza na porção citosólica do transportador e é o responsável pela clivagem do peptídeo-líder (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; COTTER, HILL & ROSS, 2005).

A biossíntese dos lantibióticos geralmente é regulada por um sistema de dois componentes: uma histidina-cinase (LanK) e um regulador de resposta (LanR), como é o caso da nisina. Em resposta a um sinal externo, LanK se autofosforila em um resíduo de His presente no seu domínio C-terminal, citoplasmático. O fosfato é então transferido para um resíduo de Asp de LanR. Uma vez ativado, LanR promove a ativação da transcrição dos genes envolvidos na biossíntese dessas bacteriocinas. Alguns lantibióticos não apresentam genes envolvidos diretamente com a sua regulação, como é o caso da lacticina 3147. Entretanto, outros fatores podem afetar a produção desses peptídeos, tais como as condições de cultura da estirpe produtora e a fase do crescimento da bactéria (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; BIERBAUM & SAHL, 2009).

A produção de bacteriocinas está sempre ligada à expressão de um sistema específico de imunidade, essencial para a proteção da célula produtora contra a ação da sua bacteriocina cognata. A maioria dos grupamentos genéticos envolvidos na biossíntese dos lantibióticos, especialmente entre aqueles que se ligam ao lipídeo II, apresenta um transportador do tipo ABC, LanFEG, relacionado com o fenótipo de imunidade da estirpe produtora (BIERBAUM & SAHL, 2009). Uma proteína LanI também pode estar envolvida com esse fenótipo. As proteínas LanI já descritas não apresentam similaridade entre elas. Este grupo inclui peptídeos pequenos (57-69 ácidos aminados), como a PepI, envolvida na imunidade da Pep5, e proteínas grandes como NisI, envolvida na imunidade da nisina (BIERBAUM & SAHL, 2009).

Adicionalmente, alguns grupamentos genéticos apresentam ainda um gene adicional, *lanH*, como por exemplo, a nukacina ISK-I e a epidermina. As proteínas LanH atuam auxiliando LanFEG (BIERBAUM & SAHL, 2009).

Os determinantes genéticos dos lantibióticos podem estar codificados no cromossomo da célula bacteriana (ex.: epilancina K7), mas geralmente eles são encontrados em plasmídeos (ex.: nukacina ISK-1), podendo estar organizados sob a forma de operons. Análises comparativas desses genes sugerem que se tratam de sequências conservadas envolvidas em funções similares (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001).

Recentemente, uma nova classificação para os lantibióticos foi proposta, reagrupando esses peptídeos entre três novas classes: A, B e C (BIERBAUM & SAHL, 2009).

Os lantibióticos do tipo A são peptídeos mais flexíveis e alongados, que atuam sobre a membrana plasmática. Eles estão ainda divididos em mais dois subtipos: AI e AII. Os lantibióticos do subtipo AI apresentam duas enzimas de modificação, LanB e LanC, sendo a nisina o protótipo deste grupo. Todos os demais lantibióticos apresentam uma única enzima de modificação, LanM. Os peptídeos da família da lacticina 481 são classificados como do subtipo AII (BIERBAUM & SAHL, 2009).

Já, os do tipo B apresentam uma forma globular rígida e atuam por inibição enzimática da biossíntese da parede celular, como, por exemplo, a mersacidina e a cinamicina (BIERBAUM & SAHL, 2009).

Os lantibióticos do tipo C são compostos por dois componentes, como a lacticina 3147 e a estafilococcina C55 (HENG *et al.*, 2007). Bierbaum e Sahl (2009) propuseram, ainda, uma nova subclasse incluindo peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana reduzida, ou mesmo que não apresentam atividade bactericida. Esses lantibióticos têm ação morfogenética, como é o caso de SapT e de SapB, e aqui estão sendo chamados de lantibióticos do tipo D.

Os lantibióticos podem apresentar dois modos de ação distintos, inicialmente descritos para a nisina. Este peptídeo se ancora na superfície celular através da ligação do seu terminal amino ao lipídeo II (transportador de subunidades de peptideoglicana do citoplasma para a parede celular), presente na superfície das bactérias, formando uma estrutura intermediária. Esta estrutura é mantida por pontes de hidrogênio, formadas entre os ácidos aminados do anel presente no terminal amino da nisina e o lipídeo II. Em seguida, o terminal carboxi deste lantibiótico se insere na membrana plasmática. A inserção de múltiplos peptídeos leva à formação de poros na membrana celular (FIGURA 2). Consequentemente, ocorre o efluxo de pequenas moléculas e a dissipação do potencial de membrana, resultando na morte da célula-alvo. Provavelmente, a habilidade da nisina em inibir a germinação de esporos está relacionada com a formação de poros na membrana das células nos primeiros estágios da germinação (BIERBAUM & SAHL, 2009).

A nisina pode ainda inibir a biossíntese da parede celular das células sensíveis (FIGURA 2). Embora este tenha sido considerado um mecanismo secundário dos lantibióticos do tipo A, atualmente os dois mecanismos estão sendo considerados igualmente importantes (BIERBAUM & SAHL, 2009).

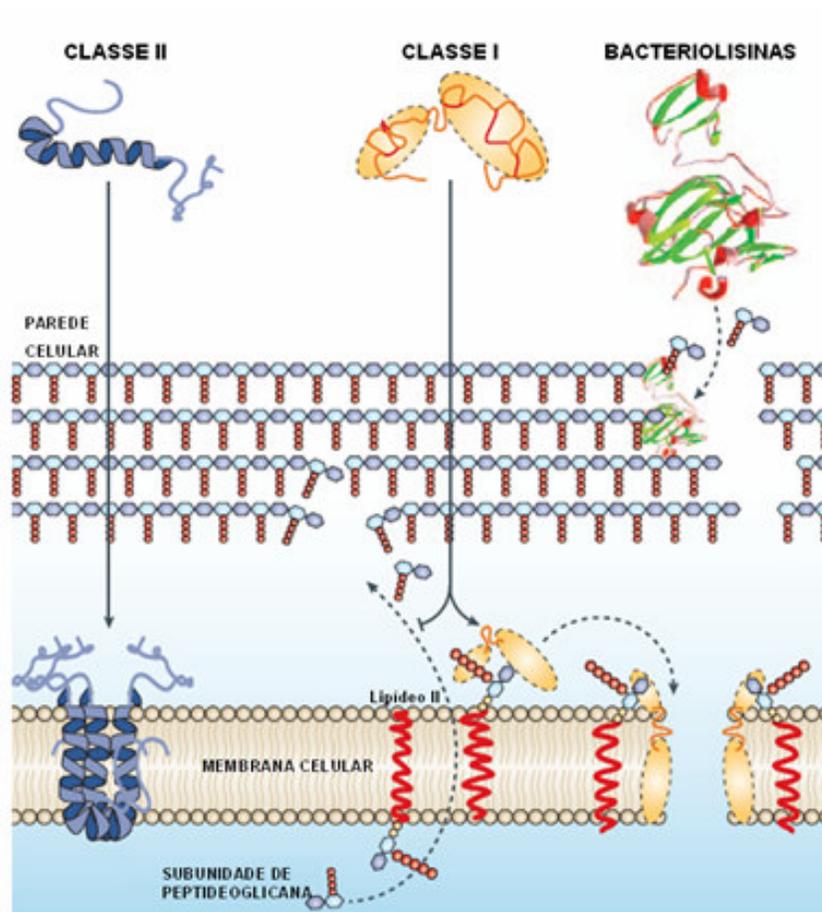


FIGURA 2: Modo de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas. Alguns lantibióticos, como a nisina, podem apresentar dois mecanismos de ação distintos. Esses peptídeos podem se ligar ao lipídeo II, inibindo a síntese da parede celular. Adicionalmente, eles também podem utilizar o lipídeo II como âncora para se inserirem na membrana, formando poros. Os peptídeos de classe II, em geral, possuem uma estrutura helicoidal anfipática que favorece a sua inserção na membrana celular, promovendo sua despolarização. As bacteriolisinas (pertencentes à classe III) podem atuar diretamente sobre a parede celular, degradando-a (adaptado de COTTER, HILL & ROSS, 2005).

3.2. Bacteriocinas de classe II

As bacteriocinas que compõem a classe II são peptídeos menores do que 10 kDa e que não possuem ácidos aminados modificados após a tradução. Devido ao grande número desses peptídeos descritos, justificou-se a sua divisão em quatro subclasses (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

As bacteriocinas pertencentes à subclasse IIa são também conhecidas como pediocinas, devido à pediocina PA-1 (MARUGG *et al.*, 1992), primeiro membro deste grupo que foi amplamente estudado. Os peptídeos desta subclasse geralmente apresentam entre 37 e 48 ácidos aminados e uma sequência N-terminal conservada Tyr-Gly-Asn-Gly-Val/Leu presente no peptídeo final (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Com base na sua estrutura primária, essas bacteriocinas parecem possuir dois domínios: um domínio N-terminal, catiônico, hidrofílico e altamente conservado, e um domínio C-terminal conservado e mais hidrofóbico, composto por aproximadamente 18 ácidos aminados (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Esses peptídeos agem permeabilizando a membrana das células sensíveis (FIGURA 2). O seu terminal amino se liga à membrana das células-alvo através de interações eletrostáticas e, em seguida, o terminal carboxi, mais hidrofóbico, penetra na bicamada lipídica. Conseqüentemente, ocorre o efluxo de pequenas moléculas, como ATP, e a dissipação do potencial de membrana, resultando na morte celular (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

As pediocinas também apresentam atividade contra *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno associado a alimentos, causador de listeriose e de mastite bovina (BOURRY, COCHARD & POUTREL, 1997; ENNAHAR *et al.*, 2000).

A *L. monocytogenes* é um cocobacilo Gram-positivo, não esporulado, aeróbio, que cresce sob refrigeração (4°C) e baixo pH, fatores que geralmente previnem a proliferação da maioria das bactérias (DAESHEL, 1993). A *L. monocytogenes* pode ser transmitida através do contato com mãos, utensílios ou alimentos contaminados e aerossóis (BOURRY, COCHARD & POUTREL, 1997). Esta bactéria é o principal agente etiológico da listeriose, uma doença que acomete, principalmente, pessoas com o sistema imune comprometido, mulheres grávidas e idosos. A maioria dos casos de listeriose humana está relacionada ao consumo de alimentos contaminados, como leite e saladas (CHAN & WIEDMANN, 2008). Ela também é responsável por grandes perdas econômicas: é fatal para 60% dos animais infectados e a mastite pode provocar a contaminação do leite.

Todas as bacteriocinas da subclasse IIa, já caracterizadas, são produzidas por bactérias do ácido láctico e foram isoladas de alimentos, como a pediocina PA-1 (MARUGG *et al.*, 1992), a mesentericina Y105 (FLEURY *et al.*, 1996), a leucocina A (HASTINGS *et al.*, 1991) e a enterocina P (HERRANZ *et al.*, 2001).

Os eventos que envolvem a biossíntese das bacteriocinas da subclasse IIa incluem a síntese do pré-peptídeo, o seu processamento e a sua secreção, que é mediada por um transportador do tipo ABC e por uma proteína acessória, que representam as proteínas de ligação à membrana - Figura 3. Estas proteínas formam um sistema exclusivo para o transporte da bacteriocina, independente do sistema *sec*, via tradicional de secreção de proteínas nas células bacterianas (LEE & SCHNEEWIND, 2001).

O processamento das bacteriocinas desta subclasse se dá, geralmente, pela clivagem do peptídeo-líder em uma posição adjacente a dois resíduos de Gly, conservados nesses peptídeos, que atuam, portanto, como sinal de reconhecimento para o processamento e, também, para o transporte da bacteriocina, independente do sistema *sec* - Figura 3 (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

As proteínas de imunidade apresentam entre 85 e 115 resíduos de ácidos aminados e, além de conferirem imunidade contra a bacteriocina cognata, podem conferir imunidade contra outras bacteriocinas similares - Figura 3 (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Assim como os genes que codificam os lantibióticos, os genes envolvidos na biossíntese das bacteriocinas da subclasse IIa parecem estar presentes tanto em plasmídeos como no cromossomo bacteriano, e podem ser transcritos sob a forma de um ou dois operons. O seu mecanismo de biossíntese pode ser regulado por um sistema do tipo *quorum sensing*, composto por três componentes - uma histidina-cinase, um regulador de resposta e um fator de indução, que atua como um sinal para induzir a transcrição dos genes-alvo (FIGURA 3). Esses fatores de indução são pequenos peptídeos, termoestáveis, catiônicos e hidrofóbicos, e também são sintetizados como um pré-peptídeo com uma sequência-líder do tipo glicina-dupla (ENNAHAR *et al.*, 2000).

A subclasse IIb se caracteriza por ser formada por complexos compostos por dois peptídeos diferentes. Em alguns casos, os dois peptídeos são essenciais para que haja atividade antimicrobiana, como as lactococcinas G α /G β (NISSEN-MEYER *et al.*, 1992). Estes peptídeos permeabilizam a membrana das células sensíveis para diferentes pequenas moléculas e parecem possuir especificidade a esse respeito. Por exemplo, a lactococcina G permeabiliza a membrana para cátions monovalentes, como Na⁺ e K⁺, mas não para cátions divalentes, como o Mg²⁺, ou ânions, como o fosfato, e H⁺ (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

As bacteriocinas cíclicas, cujo primeiro e o último ácidos aminados do peptídeo maduro estão ligados covalentemente, foram agrupadas em um grupo distinto, a subclasse IIc [ex.: enterocina AS-48 (MAQUEDA *et al.*, 2008)]. Todas as bacteriocinas cíclicas cujo modo de ação foi estudado causaram danos à membrana das células sensíveis e, eventualmente, a lise celular. Aparentemente, a estrutura dessas bacteriocinas confere resistência à ação de proteases e favorece a estabilidade desses peptídeos (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

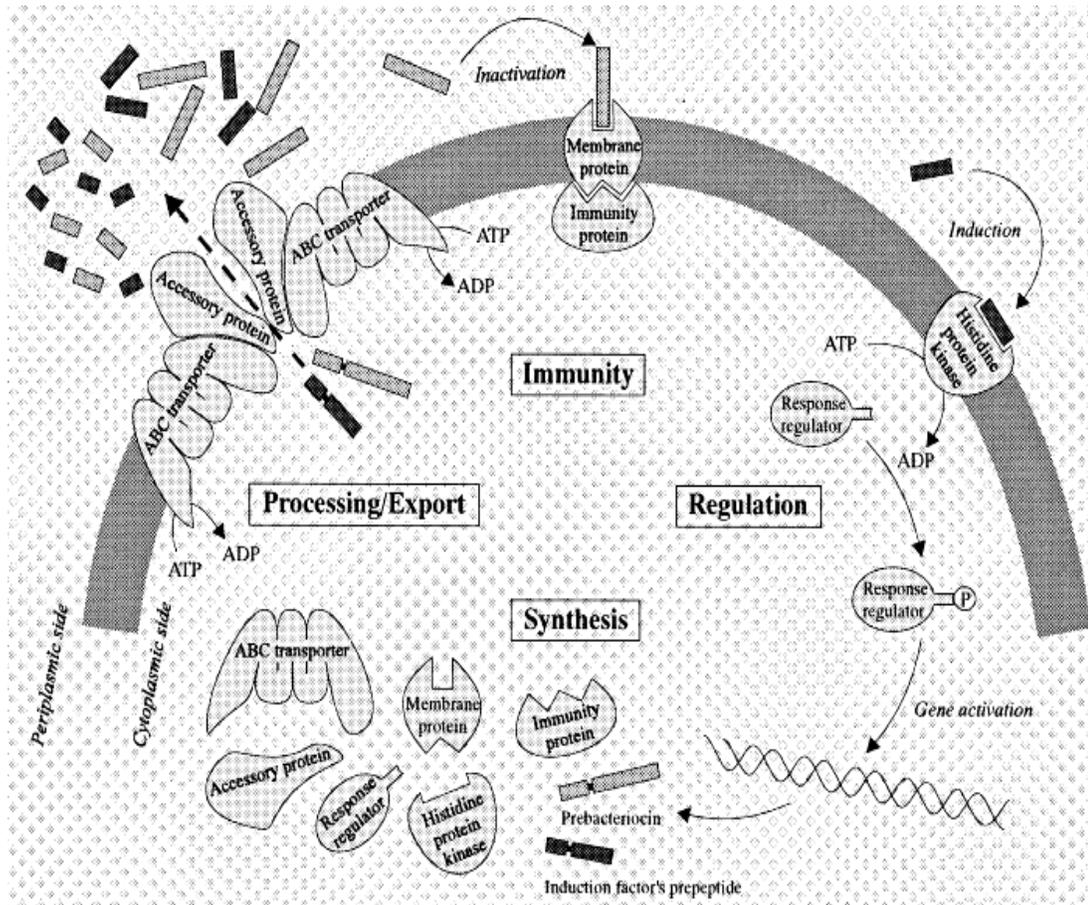


FIGURA 3: Produção das bacteriocinas da subclasse IIa: sistema regulatório de três componentes, síntese, processamento, excreção e imunidade. Os eventos que envolvem a biossíntese das bacteriocinas da subclasse IIa incluem a síntese do pré-peptídeo, o seu processamento e a sua secreção, que é mediada por um transportador do tipo ABC e por uma proteína acessória. A biossíntese destas bacteriocinas pode ser regulada por um sistema do tipo *quorum sensing*, composto por três componentes - uma histidina-cinase, um regulador de resposta e um fator de indução, que atua como um sinal para induzir a transcrição dos genes-alvo. Esses fatores de indução são pequenos peptídeos, termoestáveis, catiônicos e hidrofóbicos, e também são sintetizados como um pré-peptídeo com uma sequência-líder do tipo glicina-dupla. As proteínas de imunidade conferem imunidade contra a bacteriocina cognata e também podem conferir imunidade contra outras bacteriocinas similares (ENNAHAR *et al.*, 2000).

A subclasse IId compreende as bacteriocinas compostas por um único peptídeo, que não sofre modificações após a tradução e que não é do tipo pediocina (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009), como a aureocina A53 (NETZ *et al.*, 2002).

Embora Nissen-Meyer e colaboradores (2009) classifiquem a aureocina A70 como pertencente à subclasse IId, uma quinta subclasse (Ile) seria mais apropriada para esta bacteriocina, uma vez que ela é composta por quatro peptídeos diferentes (NETZ *et al.*, 2001).

3.3. Bacteriocinas de classe III

A classe III é composta por peptídeos maiores do que 10 kDa, geralmente termolábeis. As bacteriocinas de classe III também estão divididas em duas subclasses: subclasse IIIa e subclasse IIIb. A subclasse IIIa compreende as bacteriolisinas, ou seja, enzimas com atividade bacteriolítica, atuando diretamente sobre a parede celular de bactérias Gram-positivas (FIGURA 2). A lisostafina é o protótipo deste grupo. Esta bacteriolisina foi inicialmente descrita na década de 1960 e é uma enzima extracelular secretada pela estirpe de *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* ATCC1362. As bacteriocinas não líticas caracterizam a subclasse IIIb. A ação dessas bacteriocinas promove a dissipação da força próton-motora, levando ao extravasamento de ATP e morte celular, sem causar lise da célula-alvo (HENG *et al.*, 2007).

4. Os *Staphylococcus* spp. e a produção de bacteriocinas

4.1. O Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* atualmente apresenta 41 espécies e 24 subespécies descritas, pertencendo à família Staphylococcaceae. Ele é composto por bactérias Gram-positivas em forma de cocos, anaeróbias facultativas, catalase-positivas e a sua divisão celular se dá em vários planos, formando cachos irregulares - característica que deu nome ao grupo. O seu genoma contém entre 30 e 45% de bases G+C (EUZÉBY, 2009).

Principais colonizadores da epiderme humana, os estafilococos são também encontrados no trato respiratório superior, compondo a microbiota anfibiônica humana (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Também é possível se encontrar essas bactérias em recifes de corais (LAMPERT *et al.*, 2008), compondo a microbiota intestinal de lagartas (VAN DER HOEVEN, BETRABET & FORST, 2008), além de rejeitos de minas de metais pesados, como zinco e chumbo, em altas altitudes, habitats com altas concentrações salinas ou, ainda, sob radiação UV (DIB *et al.*, 2008).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão divididas em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN). Os SCP são capazes de produzir a coagulase, uma enzima responsável pela coagulação do plasma sanguíneo. A designação SCN refere-se a todas as espécies deste gênero que não produzem esta enzima (BANNERMAN & PEACOCK, 2007; EUZÉBY, 2009).

A espécie *Staphylococcus aureus*, um SCP, pode ser considerada a principal espécie de importância médica do gênero, estando associada a infecções, tanto hospitalares como comunitárias, além de apresentar grande relevância para a medicina veterinária. Tal valor clínico se deve à combinação dos diferentes fatores de virulência produzidos por esta bactéria, à sua capacidade invasora e à emergência de estirpes resistentes a diferentes antibióticos. A maioria das estirpes desta espécie produz enzimas e citotoxinas que incluem a coagulase, como já mencionado, além de hemolisinas, nucleases, proteases, hialuronidases e colagenases. Algumas estirpes também são capazes de produzir uma ou mais exoproteínas, como a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, subtipos C₁, C₂, C₃, SED, SEE, SEG, SEH e SEI), toxinas esfoliativas (ETA e ETB), leucocidina, além de cápsula e biofilme - TABELA 2 (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2005; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Embora os *S. aureus* sejam classificados como patógenos extracelulares, eles podem infectar fagócitos, células endoteliais e fibroblastos do organismo hospedeiro (BAYLES *et al.*, 1998). O processo de invasão se inicia pela adesão da bactéria à superfície da célula hospedeira através de proteínas ligantes de fibronectina, induzindo a formação de pseudópodos e, conseqüentemente, a sua fagocitose. Uma vez internalizada, a bactéria pode induzir a apoptose celular ou sobreviver no citoplasma hospedeiro, escapando do vacúolo antes da formação do fagolisossomo. A habilidade do *S. aureus* de sobreviver no ambiente intracelular favorece as infecções estafilocócicas crônicas, como a mastite bovina, pois confere proteção à bactéria contra o sistema de defesa hospedeiro, ou mesmo contra a terapia com antibióticos (KRUT *et al.*, 2003).

Além dos diversos fatores de virulência descritos em estirpes de *S. aureus*, um outro atributo dessas bactérias tem complicado o tratamento das infecções estafilocócicas: a sua resistência a múltiplos antibióticos, principalmente aos β -lactâmicos (DANCER, 2008).

A emergência e a disseminação de estirpes de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) tiveram início nos anos 60 e na década de 90 já causavam sérias dificuldades no tratamento de infecções estafilocócicas, sendo hoje um problema significativo nos hospitais (CHAMBERS, 1997; BANNERMAN & PEACOCK, 2007). A propagação dos MRSA é contínua e a incidência de infecções por MRSA, adquiridas na comunidade (CA-MRSA), tem aumentado nos últimos anos (LECLERCQ, 2009).

TABELA 2: Principais fatores de virulência de *S. aureus*.

| Fator de Virulência | Efeito | Referência |
|---|---|--|
| Cápsula | Resistência à fagocitose | O'RIORDAN & LEE, 2004 |
| Coagulase | Coagulação do plasma sanguíneo, formação de coágulo | MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2005 |
| Colagenase | Degradação de colágeno | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, subtipos C ₁ , C ₂ , C ₃ , SED, SEE, SEG, SEH e SEI) - superantígeno | Intoxicação alimentar: vômito, diarreia ou mesmo choque | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Hemolisinas (α , β , γ e δ) | Hemólise | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Hialuronidase | Degradação do ácido hialurônico | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Leucocidina | Destruição de leucócitos, proporcionando escape, das células bacterianas, da fagocitose | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Lipases | Degradação de lipídeos | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Nucleases | Degradação dos ácidos nucleicos | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Protease | Degradação de proteínas | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Produção de biofilme | Adesão intercelular e sobre superfícies | CUCARELLA <i>et al.</i> , 2001; GÖTZ, 2002 |
| Toxina da Síndrome do Choque Tóxico-1 (TSST-1) - superantígeno | Choque sistêmico – síndrome do choque tóxico | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |
| Toxinas Esfoliativas (ETA e ETB) | Descamação da pele, choque | DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000 |

O determinante genético da resistência à metilina em estirpes MRSA é, geralmente, o gene *mecA*, que codifica uma proteína do tipo PBP (proteína ligante de penicilina), a PBP 2A - uma PBP alternativa. Esta proteína, assim como a PBP clássica, tem atividade de transpeptidase, atuando na biossíntese da parede celular, mas possui baixa afinidade por antibióticos β -lactâmicos. Esses antibióticos agem na célula bacteriana inibindo a biossíntese da parede, provocando a morte da bactéria. A presença da PBP 2A promove a síntese da parede celular bacteriana ainda que o antibiótico esteja sendo administrado (CHAMBERS, 1997).

O gene *mecA*, que codifica a PBP 2A, é carregado por um elemento genético móvel, o fragmento *mec* do cassete cromossômico estafilocócico (SCC *mec*), caracterizado pela presença de terminais com repetições invertidas, um sítio específico contendo genes que codificam uma recombinase (*ccrA* e *ccrB*), o gene *mecA* e outros genes de resistência a diferentes antibióticos - o que dificulta ainda mais a escolha da abordagem terapêutica contra essas infecções (CHAMBERS, 1997).

Uma segunda PBP alternativa, a PBP 4, tem se mostrado importante para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos em CA-MRSA, que não apresentam o gene *mecA*. Assim como a PBP 2A, a PBP 4 é uma proteína de baixo peso molecular, com atividade de transpeptidase e uma baixa afinidade pela maior parte dos antibióticos β -lactâmicos (MEMMI *et al.*, 2008).

O glicopeptídeo vancomicina foi introduzido na clínica médica em 1958 para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. O aumento do uso deste agente antimicrobiano, nas últimas duas décadas, se deve, principalmente, à prevalência de estirpes de SCN e de MRSA nos casos de infecções nosocomiais. Embora estas bactérias apresentem resistência a diferentes antibióticos, elas permaneceram sensíveis aos glicopeptídeos. As primeiras estirpes de *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina apareceram na clínica médica no início da década de 80, em SCN, e, em 1997, surgiram os primeiros relatos de resistência em *S. aureus*, provocando grande alarme na comunidade médica quanto às alternativas terapêuticas a serem empregadas nas infecções causadas por *Staphylococcus* spp. (SRINIVASAN, DICK & PERL, 2002).

Os SCN são colonizadores da epiderme humana e, até a década de 1970, essas bactérias foram consideradas não-patogênicas. Porém, esses microrganismos têm sido associados a diversos quadros de infecções humanas e animais. Nas últimas décadas, mais de 30 espécies de SCN foram descritas, sendo as espécies *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus hominis* as de principal importância médica. As demais espécies estão associadas principalmente a animais (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002).

Geralmente, as infecções humanas por SCN estão relacionadas ao uso de dispositivos médicos ou implantes e são capazes de provocar bacteriemia ou mesmo

septicemia. As infecções ocorrem devido aos diversos fatores de virulência que essas bactérias apresentam, como a produção de elastase (uma protease capaz de degradar IgM, IgA, albumina, fibrinogênio e fibronectina), de lipases e, principalmente, devido a sua habilidade de formar biofilmes (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

A formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. protege esses microrganismos tanto da ação do sistema imune do hospedeiro, como da ação de antibióticos, tendo implicação nas infecções nosocomiais envolvendo dispositivos médicos (GÖTZ, 2002; OTTO, 2008).

A formação do biofilme, por bactérias do gênero *Staphylococcus*, se dá em duas fases. A primeira envolve a ligação da bactéria à superfície de polímeros, à matriz extracelular ou mesmo à superfície celular do hospedeiro, pela sua interação eletrostática com a superfície da célula bacteriana. Somente na segunda fase, a bactéria se prolifera em múltiplas camadas, envolvida por uma matriz extracelular (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002).

Dentre os estafilococos, o componente da matriz extracelular que origina o biofilme é um polissacarídeo cuja biossíntese está relacionada ao operon *icaABDC*, que é regulado pelo gene *icaR*, um possível repressor. Em SCN, em especial *S. epidermidis*, este polissacarídeo é uma molécula linear formada por β -1,6 *N*-acetilglicosamina (poli β -1,6 *N*-acetilglicosamina, PIA - "polysaccharide intercellular adhesin", polissacarídeo de adesão intercelular). Cerca de 20% desses resíduos encontram-se deacetilados e positivamente carregados (GÖTZ, 2002). Na estirpe *S. aureus* MN8N, foi descrita uma substância similar ao PIA, o PNSG, poli-*N*-succinil β -1,6-glicosamina. A implicação do operon *ica* na patogênese de *Staphylococcus* spp. tem sido demonstrada em diferentes modelos animais e a imunização com PIA-PNSG tem se mostrado eficiente contra infecções por *S. aureus* (MCKENNEY *et al.*, 1999).

Diferentes experimentos de clonagem e análise da biossíntese de PIA *in vitro* - analisando-se a fração das membranas bacterianas e do extrato extracelular - demonstraram que as proteínas IcaA, C e D ficam localizadas na membrana, enquanto IcaB é encontrada no sobrenadante das culturas. A similaridade da sequência de IcaB com deacetilases sugere que esta proteína é a responsável pela deacetilação do polímero, após a sua passagem pela membrana plasmática. IcaA e IcaC têm atividade de transferase e IcaD atua como uma chaperona, direcionando o dobramento correto da molécula e a sua inserção na membrana plasmática. O modelo da biossíntese de PIA, no gênero *Staphylococcus*, está esquematizado na FIGURA 4 (GÖTZ, 2002).

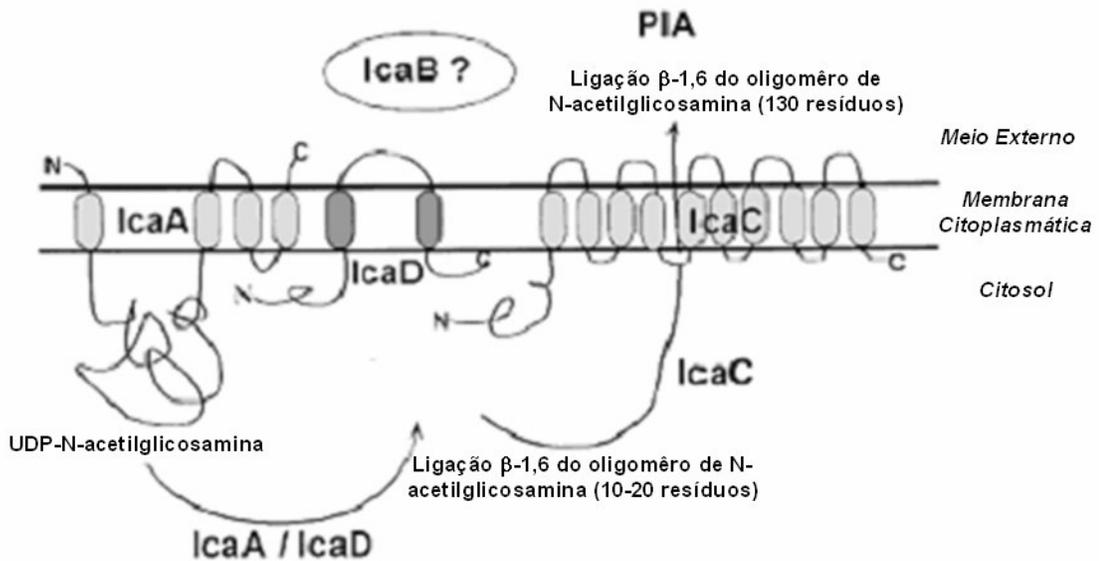


FIGURA 4. Modelo da biossíntese de PIA. IcaA e IcaD estão envolvidas na síntese de um polímero derivado da UDP-*N*-acetilglicosamina, que pode possuir de 10 a 20 resíduos de β -1,6 *N*-acetilglicosamina, e na sua inserção na membrana plasmática. IcaC provavelmente está envolvida no alongamento deste polímero, que pode chegar a apresentar até 130 resíduos. IcaB possivelmente está relacionada com a deacetilação do polímero (adaptado de GÖTZ, 2002).

Ensaio com mutantes de *S. aureus* cuja estrutura do ácido teicoico foi alterada, mas a produção de PIA permaneceu inalterada, demonstraram a importância do balanço de cargas da superfície de bactérias Gram-positivas para a adesão. O aumento da carga negativa da superfície celular, causada pela modificação do ácido teicoico, impede a ligação das células bacterianas ao poliestireno e à superfície de vidros - primeira etapa para a formação do biofilme *in vitro* (GÖTZ, 2002).

A produção de biofilme pode ser influenciada por diferentes fatores. Ensaio *in vitro* têm demonstrado que meios ricos em glicose, condições limitantes de O₂, altas temperaturas e osmolaridade e a administração de eritromicina, em concentrações subinibitórias, induzem a expressão do operon *ica*, sugerindo o envolvimento de outros genes reguladores na sua expressão. Em *S. aureus*, este evento parece estar estreitamente relacionado com a baixa tensão de O₂. Estirpes que apresentam fenótipo negativo para a produção de biofilme sob condições ótimas de oxigênio tiveram a produção de biofilme aumentada em condições anóxicas (CRAMTON *et al.*, 2001; GÖTZ, 2002).

Outros mecanismos, independentes do operon *ica*, têm sido relacionados com a produção de biofilme em *S. aureus*. A proteína Bap (“biofilm associated protein”, proteína associada a biofilme), de 254 kDa, está relacionada com a formação de biofilme em estirpes de *S. aureus* e de SCN isoladas de quadros crônicos de mastite ou de infecções humanas (CUCARELLA *et al.*, 2001; POTTER *et al.*, 2009). Esta proteína, provavelmente, é responsável pela adesão célula-célula que permitiria a formação de múltiplas camadas, independente da presença do polissacarídeo PNSG. Embora a expressão do gene *bap* não seja afetada pela presença de Ca²⁺, a atividade da proteína Bap é negativamente regulada na presença deste íon, em concentrações superiores a 6 mM, inibindo a formação de biofilme (CUCARELLA *et al.*, 2001; ARRIZUBIETA *et al.*, 2004).

Algumas outras moléculas já foram relacionadas com a produção de biofilme em estafilococos: a proteína associada à acumulação [“accumulation-associated protein”- Aap, (HUSSAIN *et al.*, 1997; VANDECASTEELE *et al.*, 2003)]; a proteína G de superfície de *S. aureus* [“*S. aureus* surface protein G” - SasG (CORRIGAN *et al.*, 2007)]; o fator de agregação A [“clumping factor A” - ClfA (GÖTZ, 2002)]; a proteína de ligação ao fibrinogênio [“fibrinogen binding protein of *S. epidermidis*” - Fbe), que é similar ao ClfA (GUO, *et al.*, 2007), e a autolisina E, AtlE (HEILMANN *et al.*, 1997).

4.2. Elementos Genéticos Móveis de *Staphylococcus* spp.

O elemento genético móvel de maior importância médica, no gênero *Staphylococcus*, é o SCC *mec*, que carrega o gene *mecA* (CHAMBERS, 1997), como já mencionado anteriormente. Entretanto, variados tipos de elementos de transposição já foram encontrados nos estafilococos, dentre transpósons conjugativos, transpósons

complexos ou compostos e sequências de inserção. Alguns integrons, plataformas genéticas móveis capazes de incorporar sequências abertas de leitura (“open reading frame”, ORF), codificadoras de genes de resistência a diferentes antibióticos (cassetes de genes), também já foram identificados (MAZEL, 2006).

Recentemente, um integron da classe 1 foi encontrado em duas estirpes MRSA, isoladas de infecções nosocomiais na China (XU *et al.*, 2008). O mesmo grupo já havia detectado a presença de integrons da classe 1 em 16 estirpes de *S. aureus*, também isoladas de infecções nosocomiais (XU *et al.*, 2007).

Os elementos de transposição são segmentos de DNA de fita dupla, que podem se inserir repetidas vezes em um ou mais sítios do genoma de um organismo. Eles apresentam terminais com repetições invertidas (8 a 48 pb), os quais são sítios essenciais à transposição, e, geralmente, codificam pelo menos uma função, a transposase, uma endonuclease capaz de se ligar às repetições invertidas presentes nas extremidades do elemento e realizar a transposição. Geralmente, a transposição desses elementos causa a duplicação do seu sítio-alvo, cujo tamanho varia de 2 a 14 pb (ROBERTS *et al.*, 2008).

A IS256 é um elemento comumente encontrado nos genomas de estafilococos e enterococos e está frequentemente presente em múltiplas cópias, inclusive flanqueando o Tn4001. Este elemento é significativamente mais frequente em cepas de *S. epidermidis* de origem clínica (GU *et al.*, 2005).

O Tn6009, um transpóson conjugativo carreando o operon *mer*, que confere resistência ao mercúrio, foi encontrado em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *S. aureus*, isoladas de hospitais da Nigéria e de Portugal (SOGÉ *et al.*, 2008).

A formação de biofilme é um evento altamente regulado por um processo envolvendo diferentes fatores. Entre os *S. aureus*, a formação de biofilme está sujeita à variação de fase e colônias biofilme-negativas surgem esporadicamente, em populações bacterianas produtoras de biofilme. Este evento está relacionado com a inserção da IS256 no operon *icaADBC*, impossibilitando a sua expressão. A inserção da IS256 é um evento reversível, regulado negativamente pelo fator δ^B (VALLE *et al.*, 2007).

O elemento IS257, também conhecido como IS431, pertence à família do elemento IS6, inicialmente descrito em *E. coli*. Sequências de inserção do tipo IS257 têm sido frequentemente identificadas em diferentes espécies bacterianas, inclusive em bactérias do gênero *Staphylococcus*, o que sugere que elas têm um largo espectro de transferência horizontal. Esta sequência de inserção tem sido encontrada em bactérias isoladas de diferentes nichos ecológicos, como estirpes clínicas humanas e estirpes envolvidas em casos de mastite bovina (PETRELLI *et al.*, 2006; TUCHSCHERR *et al.*, 2007).

4.4. Estafilococcinas

As bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp. já são conhecidas desde o século XIX, quando Babes descreveu pela primeira vez a ação antagonística entre bactérias Gram-positivas, após observar a inibição do crescimento de estafilococos, em meio sólido, por outra estirpe do mesmo gênero (BABES, 1885, *apud* JACK, TAGG & RAY, 1995). Somente em 1946, surgiu o termo estafilococcina, quando Fredericq verificou que as substâncias produzidas por *Staphylococcus* spp. também inibiam o crescimento de outras bactérias Gram-positivas, mas não inibiam o crescimento de bactérias Gram-negativas (FREDERICQ, 1946, *apud* JACK, TAGG & RAY, 1995).

4.4.1. Estafilococcinas Produzidas por SCN

A espécie *S. epidermidis* é a mais estudada quanto à produção de bacteriocinas, dentre as quais as principais são: a Pep5, a epigidina 280, a estafilococcina 1580 ou epidermina, a galidermina e a epilancina K7. Outras bacteriocinas produzidas por outros SCN já foram descritas: a nukacina ISK-1 e a warnericina RB4, produzidas por *Staphylococcus warneri*, e a nukacina KQU-131, produzida por *Staphylococcus hominis*.

Pep5

A Pep5 é um lantibiótico, inicialmente purificado a partir da estirpe *S. epidermidis* 5 (SAHL & BRANDIS, 1981). A produção deste peptídeo é codificada pelos genes *pepTIAPBC* localizados no plasmídeo pED503, de 20 kb (ERSFELD-DRESSEN, SAHL & BRANDIS, 1984; KALETTA *et al.*, 1989; MEYER *et al.*, 1995).

O gene estrutural, *pepA*, codifica um pré-lantibiótico; os genes *pepB* e *pepC* codificam as enzimas necessárias para as modificações pós-tradução; o gene *pepP* codifica a proteína responsável pelo processamento proteolítico; o gene *pepT* é responsável por codificar a proteína envolvida no transporte e o gene *pepI* codifica a proteína de imunidade - FIGURA 5 (ERSFELD-DRESSEN, SAHL & BRANDIS, 1984; SAHL, HAHN & BRANDIS, 1985; KORDEL, BENZ & SAHL, 1988; KALETTA *et al.*, 1989; REIS *et al.*, 1994; BIERBAUM *et al.*, 1996; PAG *et al.*, 1999).

O peptídeo maduro possui 3.488 Da e contém três anéis (uma MeLan e duas Lan), um resíduo de oxibutiril no seu terminal amino e dois resíduos de Dhb na região central do lantibiótico (FIGURA 6).

A estirpe *S. epidermidis* 5 protege-se da ação da Pep5 exclusivamente através de PepI, um peptídeo de 69 ácidos aminados, codificado pelo gene *pepI*, localizado a montante do gene estrutural *pepA* - FIGURA 5 (REIS *et al.*, 1994; HOFFMAN *et al.*, 2004).

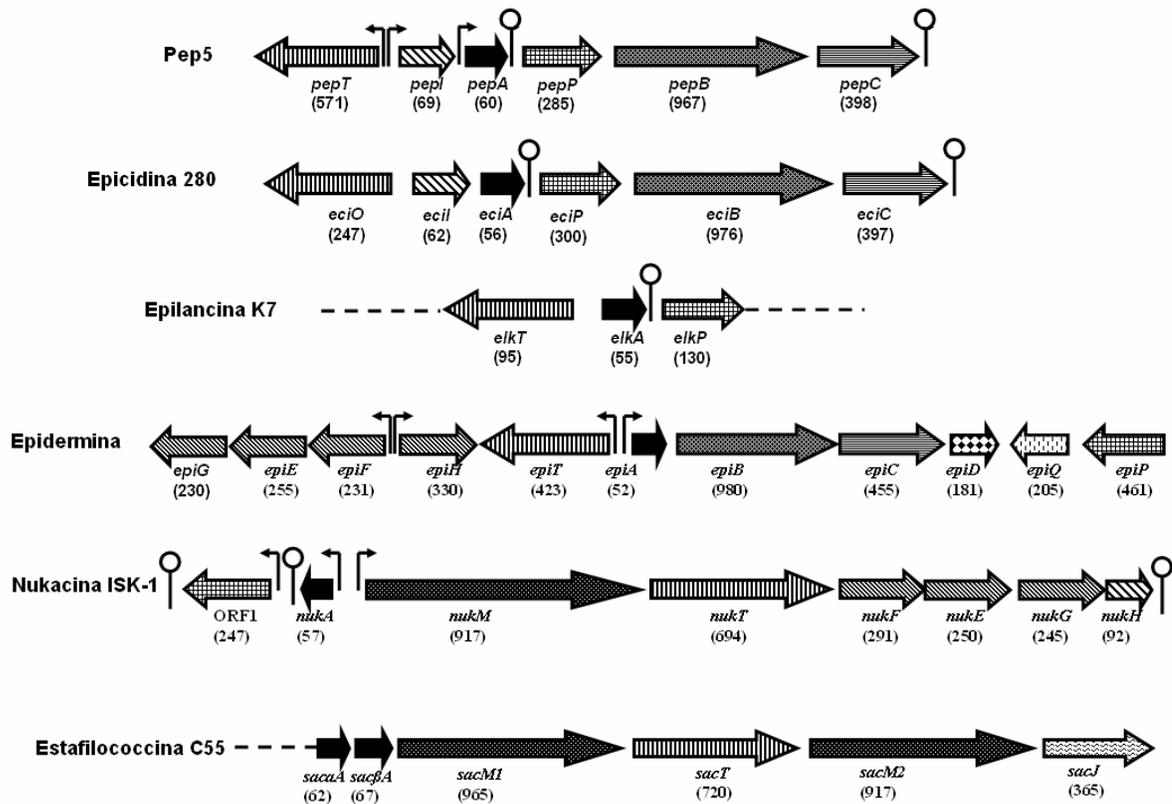


FIGURA 5: Representação esquemática dos genes envolvidos na biosíntese de lantibióticos produzidos por *Staphylococcus* spp.: Pep5, epicidina 280, epilancina K7, epidermina, nukacina ISK-1 e estafilococcina C55. Os genes estruturais são representados pelas setas pretas. Os números indicam o número de ácidos aminados de cada peptídeo correspondente. Os promotores estão indicados por setas finas e os terminadores de transcrição por grampos. O sequenciamento dos genes *elkT* e *elkP* não foi completado. Os genes que apresentam a mesma função estão representados com a mesma textura. Os genes não estão representados em escala (adaptado de BASTOS *et al.*, 2009).

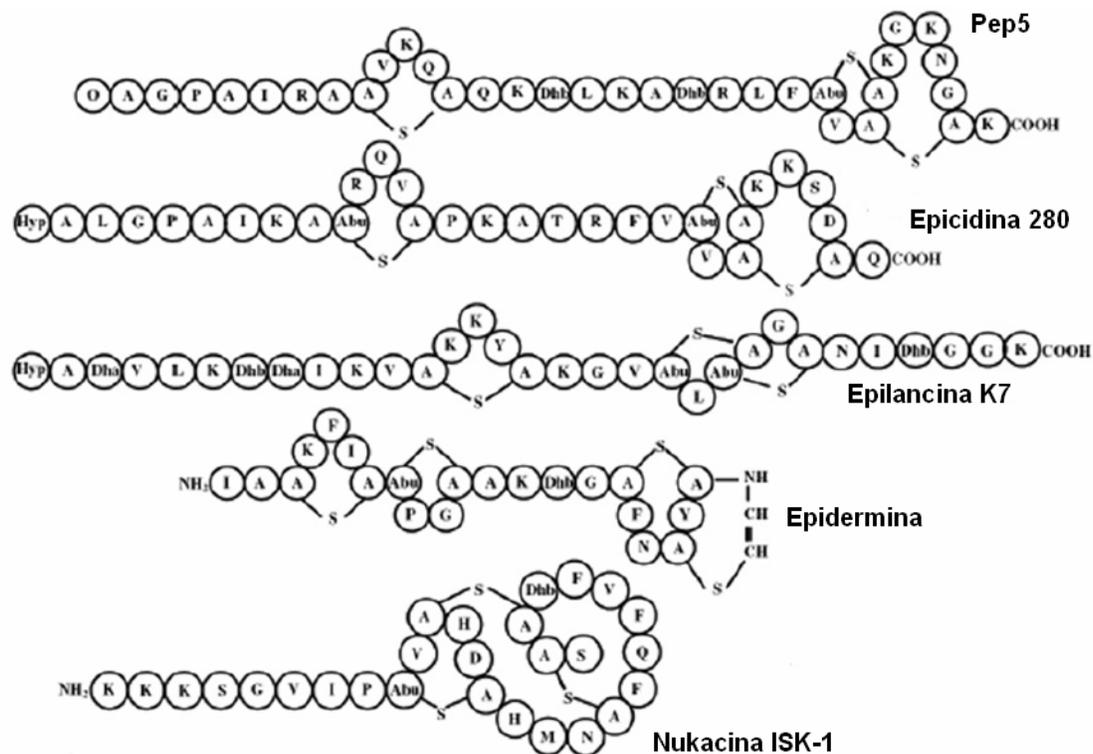


FIGURA 6: Representação esquemática da estrutura dos lantibióticos produzidos por SCN: Pep5, epicidina 280, epilancina K7, epidermina e nukacina ISK-1. Abu, ácido *N*-aminobutírico; Dha, 2-3-dideidroalanina; Ala-S-Ala, (2*S*, 6*R*)-lantionina; Abu-S-Ala, (2*S*, 3*S*, 6*R*)-3-metil-lantionina; Dhb, (*Z*)-2,3-dideidrobutirina; Hyp, 2-hidroxiopropionil; O, oxobutiril (adaptado de BASTOS *et al.*, 2009).

Epicidina 280

A epicidina 280, produzida por *S. epidermidis* BN 280, é considerada uma variante natural da Pep5 com uma massa molecular de 3,13 kDa. Os determinantes genéticos envolvidos na sua produção e na sua imunidade, *ecilAPBC* (FIGURA 5), são encontrados no plasmídeo pCH01, > 40 kb (HEIDRICH *et al.*, 1998), na mesma ordem em que os genes *pepIAPBC*, que codificam a Pep5, estão organizados no plasmídeo pED503 (MEYER *et al.*, 1995). Os genes *ecilAPBC* codificam proteínas similares a PepI, PepA, PepP, PepB e PepC.

Cerca de 59% dos ácidos aminados do pré-peptídeo da epicidina 280 são idênticos aos ácidos aminados do pré-peptídeo da Pep5 e os peptídeos maduros apresentam 75% de similaridade. Ambos os peptídeos apresentam uma sequência-líder de 26 ácidos aminados, ao passo que o peptídeo maduro da epicidina 280 é quatro ácidos aminados mais curto do que o da Pep5. Esta diferença reduz consideravelmente a flexibilidade da parte central da epicidina 280, quando comparada com a da Pep5 - FIGURA 6. Além disso, uma Pro está localizada nesta parte da epicidina 280. Estas diferenças podem ser responsáveis pelo aumento da rigidez na estrutura final da epicidina 280 e por sua reduzida atividade antimicrobiana, em comparação com a Pep5 (HEIDRICH *et al.*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2007).

PepI e EciI apresentam 74,2% de similaridade, sendo que as suas regiões amino-terminais apresentam 80% de similaridade. Além disso, as estirpes *S. epidermidis* BN 280 e *S. epidermidis* 5 apresentam imunidade cruzada. Estes dados sugerem que as proteínas de imunidade EciI e PepI são capazes de proteger as estirpes que as possuem contra ambos os lantibióticos: epicidina 280 e Pep5. Provavelmente, a proteção mediada por EciI deve basear-se no mesmo mecanismo molecular de proteção mediada por PepI (HEIDRICH *et al.*, 1998; HOFFMAN *et al.*, 2004).

Entre os genes envolvidos na biossíntese da epicidina 280, não foi encontrado um gene *lanT*, que codificaria um transportador ABC, normalmente envolvido na exportação dos lantibióticos. Embora seja possível que um transportador envolvido da exportação da epicidina 280 se encontre distante dos demais genes envolvidos na biossíntese deste lantibiótico, também é possível que esta bacteriocina não apresente um transportador específico (PESCHEL *et al.*, 1997; HEIDRICH *et al.*, 1998).

Um outro gene, *eciO*, está localizado a montante da *ecil*, no local correspondente a *pepT* (entre os genes que codificam a Pep5), mas com orientação oposta - FIGURA 5. Ele codifica uma enzima semelhante às proteínas pertencentes à família das oxidorreduções, responsável por modificações no terminal amino da bacteriocina (HEIDRICH *et al.*, 1998).

A clonagem dos genes *ecilAPBC* na estirpe *Staphylococcus carnosus* TM 300 revelou que eles são suficientes para dirigir a produção epicidina 280 neste hospedeiro.

Embora não seja essencial para a síntese do pré-peptídeo da epigidina 280, *eciO* é essencial para a formação do lantibiótico ativo (HEIDRICH *et al.*, 1998).

Epilancina K7

Embora a epilancina K7 tenha sido inicialmente identificada na década de 1970, somente 20 anos depois a sua estrutura foi elucidada por ressonância magnética nuclear. Ela é um lantibiótico do tipo A, sintetizado pela estirpe *S. epidermidis* K7, apresentando uma sequência de 31 ácidos aminados, massa molecular de 3.032 Da e seis resíduos de Lys no terminal carboxi. Assim como a epigidina 280, o seu terminal amino está bloqueado por um resíduo de 2-hidroxiopropionil (FIGURA 6). Os genes *elkA*, *elkP* e *elkT*, responsáveis pela sua biossíntese, estão localizados no cromossomo. O gene *elkA* codifica um pré-peptídeo de 55 ácidos aminados. A jusante do gene *elkA*, encontra-se o gene *elkP*, que provavelmente codifica a enzima responsável pela clivagem da sequência-líder. A montante de *elkA*, encontra-se o gene *elkT*, que provavelmente codifica uma proteína de transporte, envolvida no processamento e na exportação da epilancina K7 (VAN DE KAMP *et al.*, 1995 a e b).

A organização dos genes *elkA*, *elkP* e *elkT* se assemelha à organização dos genes *pep*, envolvidos na biossíntese de Pep5. Entre os genes *pepA* e *pepT*, está localizado o gene *pepI*. Entretanto, nenhuma ORF correspondente ao gene de imunidade foi encontrada entre os genes *elkA* e *elkT* - FIGURA 5 (VAN DE KAMP *et al.*, 1995b).

A epilancina 15X é produzida por *S. epidermidis* 15X154, uma estirpe isolada de ferida. Esta bacteriocina possui 31 ácidos aminados e a sua massa foi estimada em 3,17 kDa. A análise molecular e estrutural da epilancina 15X revelou que tanto a estrutura primária, como a terciária desta proteína, bem como a distribuição de cargas positivas ao longo da molécula são similares às da epilancina K7 (EKKELENKAMP *et al.*, 2005).

Epidermina e suas Variantes

A epidermina e suas variantes são os lantibióticos mais frequentemente produzidos pelos SNC, tendo sido isolados a partir de muitas linhagens de *S. epidermidis* e também de outras espécies estafilocócicas (BIERBAUM *et al.*, 1996). A epidermina foi primeiramente purificada a partir da cultura da estirpe *S. epidermidis* Tü 3298 (ALLGAIER *et al.*, 1986). Os genes envolvidos na sua produção estão localizados no plasmídeo pTü32, de 54 kb (AUGUSTIN *et al.*, 1992).

Esta bacteriocina apresenta uma massa molecular de 2.164,6 Da e é composta por 22 ácidos aminados. Este lantibiótico contém uma Dhb, uma Melan e duas Lan (SCHNELL *et al.*, 1988). O quarto anel da epidermina é formado pela presença de um resíduo de

aminovinil-S-D-cisteína (AviCys) no seu terminal carboxi, resultado da oxidação e da descarboxilação do último resíduo de Cys - FIGURA 6 (ALLGAIER *et al.*, 1986).

Onze genes, organizados em cinco unidades transcricionais, estão envolvidos na produção da epidermina. *epiA*, gene estrutural, e *epiBCD*, envolvidos na maturação do peptídeo, são transcritos simultaneamente. EpiB e EpiC catalisam a desidratação de resíduos de Ser e de Thr e a formação de ligações tioéteres, respectivamente. EpiD é uma enzima contendo flavina-mononucleotídeo (FMN), responsável por catalisar a reação de oxidação e descarboxilação do terminal carboxi. Os genes *epiP* e *epiQ* compreendem a segunda unidade, são transcritos na direção oposta à daqueles quatro genes e se encontram a jusante de *epiD*. A enzima EpiP apresenta homologia com serina-proteases e parece estar envolvida no processamento da sequência-líder da epidermina. EpiQ é um ativador da transcrição das unidades *epiABCD*, *epiFEG*, *epiT* e *epiH*. A montante de *epiA*, a terceira unidade transcricional engloba apenas um gene, *epiT*, que apresenta identidade com sequências de transportadores do tipo ABC, embora esta função seja defectiva, devido a uma deleção que causa uma alteração no quadro de leitura das bases subsequentes. A jusante de *epiT*, encontram-se as duas unidades de transcrição restantes: *epiFEG* e *epiH* (FIGURA 5). EpiH e EpiFEG (um transportador do tipo ABC) conferem imunidade à estirpe produtora (AUGUSTIN *et al.*, 1992; KUPKE & GÖTZ, 1996; PESCHEL & GÖTZ, 1996; HILLE *et al.*, 2001).

A galidermina, uma bacteriocina que foi inicialmente isolada da estirpe de *Staphylococcus gallinarum* DSM 4616, é uma variante natural da epidermina e apresenta 94% de identidade com este lantibiótico. A organização genética da galidermina é semelhante à organização da epidermina (BIERBAUM *et al.*, 1996).

A estafilococcina 1580, produzida pela estirpe *S. epidermidis* 1580, foi inicialmente descrita por Jetten, Vogels & Windt (1972). A análise da sua sequência de ácidos aminados, da sua massa molecular e o sequenciamento do seu terminal amino demonstraram que a estafilococcina 1580, purificada por cromatografia de troca de cátions e por cromatografia líquida de alta performance (“high performance liquid chromatography”, HPLC) em fase reversa, é idêntica à epidermina (SAHL, 1994).

A estafilococcina T, produzida por *Staphylococcus cohnii* T, uma estirpe isolada de garganta humana, também é idêntica ao lantibiótico galidermina (FURMANEK *et al.*, 1999).

Nukacina ISK-1 e suas variantes

A nukacina ISK-1 é produzida pela estirpe *S. warneri* ISK-1, isolada de um “nukadoko” (farelo de arroz fermentado). Trata-se de um lantibiótico com um pré-peptídeo de 57 ácidos aminados, dentre os quais apenas 27 estão presentes no peptídeo maduro, de

2.960 Da (FIGURA 6), e que apresenta alta similaridade com a lacticina 481 (SASHIHARA *et al.*, 2000).

Este lantibiótico manteve-se estável na faixa de pH entre 3,0 e 8,0 e reteve mais de 60% de sua atividade antimicrobiana após aquecimento a 121 °C, por 20 min (ISHAZAKI *et al.*, 2001).

A cura do plasmídeo pPI-1 resultou na perda de atividade antimicrobiana do sobrenadante da cultura e na perda de imunidade contra a nukacina ISK-1, pela estirpe, sugerindo que os determinantes genéticos responsáveis pela biossíntese desta bacteriocina e de sua proteína de imunidade cognata estão codificados nesta molécula (ASO *et al.*, 2005a).

Os dois plasmídeos pPI-1 (30,2 kb) e pPI-2 (2,8 kb), presentes na estirpe *S. warneri* ISK-1, foram sequenciados. A caracterização do plasmídeo pPI-1, que contém os genes envolvidos na biossíntese da nukacina ISK-1 e na imunidade da estirpe produtora, revelou a presença de pelo menos oito genes envolvidos na biossíntese desta bacteriocina: *nukA* (gene estrutural), *nukM*, *nukT*, *nukF*, *nukE*, *nukG*, *nukH* e *orf1* (posteriormente, designado *nukH*). Análises de transcrição revelaram que os genes *nukM*, *nukT*, *nukF*, *nukE*, *nukG* e *nukH* são transcritos sob a forma de um operon, enquanto *nukA* e *orf1* são transcritos independentemente, a partir de diferentes promotores - FIGURA 5 (SASHIHARA *et al.*, 2000; ASO *et al.*, 2004a). Estas ORFs, exceto *nukH* e *orf1*, são encontradas entre os determinantes genéticos dos lantibióticos (BASTOS *et al.*, 2009).

NukM codifica uma enzima envolvida na modificação pós-tradução, comumente encontrada nos lantibióticos do tipo lacticina 481. A clivagem do peptídeo-líder, bem como a exportação do peptídeo maduro são realizadas por um transportador do tipo ABC, *NukT*. Análises da localização celular de *NukM* e *NukT*, por “western-blot”, indicaram que ambas as proteínas estão localizadas na membrana plasmática. Duas ou mais moléculas de *NukM* e *NukT* formam um complexo na membrana plasmática e a maturação da nukacina ISK-1 ocorre pela associação da bacteriocina a este complexo. *NukM* interage especificamente com a nukacina ISK-1 e o reconhecimento da bacteriocina por ela é independente da formação do complexo com *NukT* (NAGAO *et al.*, 2005).

A nukacina ISK-1 apresenta um sistema de imunidade similar ao de lacticina 481. A coexpressão de *nukFEG* e de *nukH* em uma estirpe de *Lactococcus lactis* recombinante resultou em um alto grau de imunidade contra a nukacina ISK-1. A expressão de *nukFEG* ou *nukH* isoladamente conferiu apenas imunidade parcial contra a bacteriocina cognata, sugerindo que a imunidade contra a nukacina ISK-1 é resultado da cooperação de um transportador do tipo ABC (*NukFEG*) e de uma proteína acessória, ligadora de lantibiótico (*NukH*). Análises de “western-blot” revelaram que *NukH*, expressa em *Staphylococcus carnosus*, se localiza na membrana plasmática. Experimentos de ligação e de liberação da bacteriocina revelaram que *NukH* é capaz de se ligar tanto à nukacina ISK-1 como à

lacticina 481, mas não é capaz de se ligar à nisina. Deleções nas porções terminais de NukH não afetaram o seu funcionamento, demonstrando que estas regiões não são essenciais à imunidade. Entretanto, substituições de ácidos aminados em regiões correspondentes a alças do peptídeo resultaram na perda de sua função. Uma deleção na terceira hélice transmembrana também resultou na perda de imunidade, embora não tenha afetado a atividade de ligação de NukH à bacteriocina (ASO *et al.*, 2005b; OKUDA *et al.*, 2005).

Experimentos com a nukacina ISK-1 marcada com fluoresceína-4-isotiocianato (FITC-nuk) puderam elucidar o mecanismo cooperativo entre NukEFG e NukH. Após se ligar a NukH, a nukacina ISK-1 é transportada para o espaço extracelular por NukFEG, em um evento dependente de energia (OKUDA *et al.*, 2008 a e b).

Uma vez que o "nukadoko" contém uma grande quantidade de sais, *S. warneri* ISK-1 é apto a crescer nesta condição. A análise do efeito da concentração de NaCl, KCl e sorbitol sobre a expressão da nukacina ISK-1, por experimentos de "northern-blot", revelou que a produção deste lantibiótico é estimulada pela presença destes três componentes, (principalmente por 1,4 M de NaCl e de KCl) no meio de cultura, mostrando que a produção da nukacina ISK-1 é aumentada em condições de estresse osmótico (SASHIHARA *et al.*, 2001). Além disso, a adição de nukacina ISK-1, parcialmente purificada, ao meio de cultura não afetou os níveis de transcrição de *nukA*, sugerindo que a biossíntese deste lantibiótico não é autorregulada (ASO *et al.*, 2004b).

O produto de *orf1* apresenta homologia com LanR (proteínas reguladoras de resposta). *Orf1* apresenta um domínio N-terminal comumente encontrado nos reguladores de resposta, mas não apresenta um domínio C-terminal característico dessas proteínas (geralmente envolvido com a ativação da transcrição). Adicionalmente, nenhuma ORF correspondente à LanK foi encontrada no plasmídeo pPI-I. Portanto, a função de *orf1* ainda não foi elucidada (SASHIHARA *et al.*, 2000; ASO *et al.*, 2004b).

Duas variantes da nukacina ISK-1 já foram descritas na literatura: warnericina RB4 e nukacina KQU-131.

A warnericina RB4, produzida pela estirpe *S. warneri* RB4, também apresenta 27 ácidos aminados no peptídeo maduro, cuja massa molecular foi estimada em 2.958,2 Da. Assim como a nukacina ISK-1, a warnericina RB4 apresenta atividade antimicrobiana em diferentes valores de pH (entre 2,0 e 6,0) e é altamente resistente à temperatura, mantendo 50% da sua atividade mesmo após autoclavação. Esta bacteriocina tem ação antagonística sobre *Alicyclobacillus acidoterrestris*, um microrganismo capaz de germinar os seus esporos e crescer em pH ácido (inferior a 4,5), como o pH encontrado nos sucos de frutas. Devido a esta habilidade, o *A. acidoterrestris* é considerado um importante microrganismo deteriorante destas bebidas. A combinação destas duas características, atividade em pH

entre 2,0 e 6,0 e contra *A. acidoterrestris*, faz da warnericina RB4 uma boa candidata para o controle deste microrganismo na indústria de bebidas (MINAMIKAWA *et al.*, 2005).

A estirpe *Staphylococcus hominis* KQU-131, isolada de peixe marinho fermentado, também produz uma variante da nukacina ISK-1, a nukacina KQU-131. Esta bacteriocina apresenta apenas três resíduos de ácidos aminados diferentes da nukacina ISK-1: um está localizado na sequência-líder e os outros dois estão presentes no peptídeo maduro, incluindo a substituição de uma Lan por uma MeLan (WILAI PUN *et al.*, 2008).

A atividade da nukacina KQU-131 foi completamente inativada pela ação de proteinase K e tripsina. Após tratamento a 100°C, por 15 min, e 121°C, também por 15 min, esta bacteriocina manteve 50% e 25% de atividade, respectivamente. Estes dados sugerem que a substituição dos ácidos aminados Ser e Val, por Thr e Met, respectivamente, afetou a estrutura da bacteriocina, tornando-a mais sensível à ação da temperatura (MINAMIKAWA *et al.*, 2005).

Lisostafina

A lisostafina é uma enzima lítica de 25 kDa, capaz de hidrolisar o peptídeo-glicano das bactérias Gram-positivas, um componente importante da parede celular bacteriana. Ela possui um *pI* de 9,5 e um pH ótimo de 7,5 para a sua atividade. Ela é sintetizada na forma de uma pré-proenzima de 493 ácidos aminados e a sua secreção é iniciada pela clivagem do peptídeo-líder, de 36 ácidos aminados, presente no seu terminal amino. A proenzima liberada no meio de cultura apresenta 15 repetições em tandem, de 13 ácidos aminados, no terminal amino. Esta prolisostafina apresenta atividade antimicrobiana, mas é significativamente menos ativa do que a lisostafina madura. As repetições presentes no seu terminal amino são removidas durante o crescimento bacteriano, por cisteína-proteases secretadas pela estirpe produtora - FIGURA 7 (BASTOS *et al.*, 2009).

A lisostafina possui dois domínios distintos: (i) um domínio N-terminal, responsável pela sua atividade catalítica, e um domínio C-terminal, envolvido na sua ligação ao substrato, o peptídeo-glicano - FIGURA 7 (SIMMONDS, SIMPSON & TAGG, 1997).

Ao contrário das demais bacteriocinas, as bactérias produtoras de bacteriolisinas nem sempre possuem um sistema específico de imunidade. A sua proteção contra a bacteriolisina produzida pode estar relacionada a modificações da sua parede celular, que conferem resistência ao antimicrobiano cognato (BASTOS *et al.*, 2009).

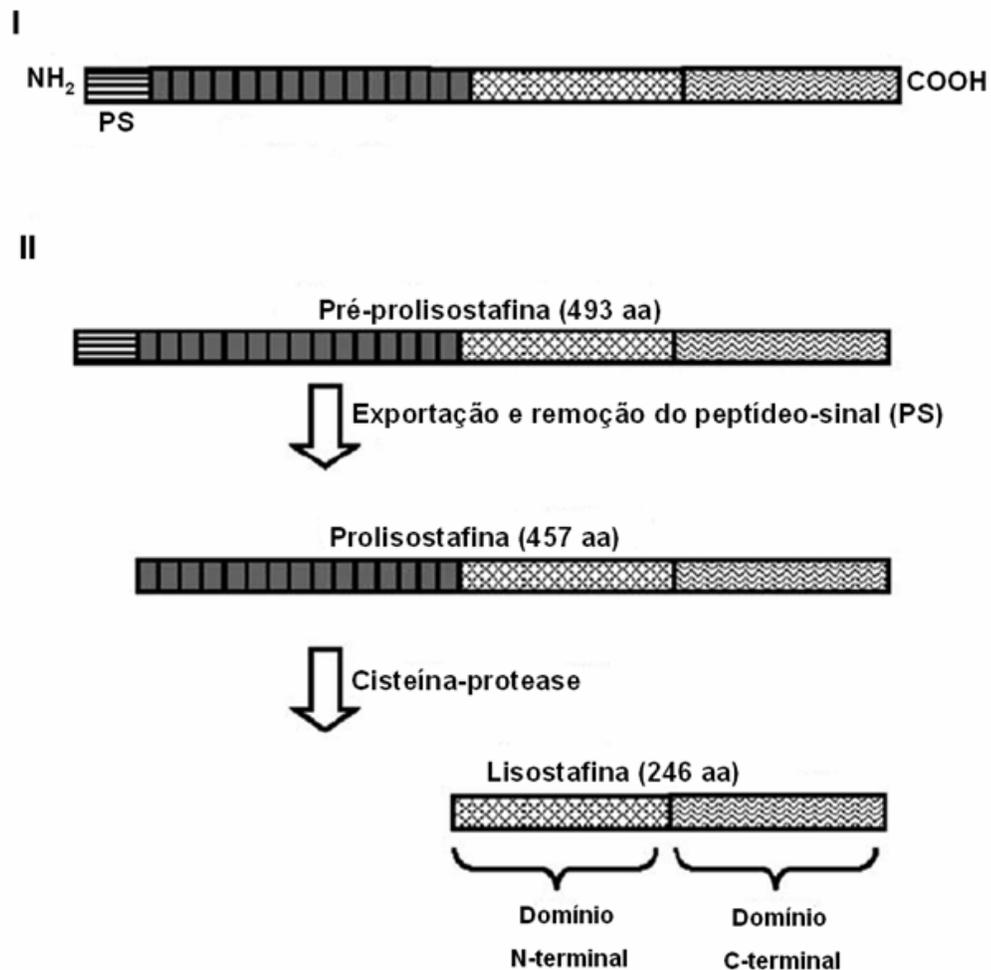


FIGURA 7: Estrutura da lisostafina. I. Domínios da pré-prolisostafina (de 493 ácidos aminados). II, A lisostafina é sintetizada como uma pré-proenzima e, após a remoção do peptídeo-sinal, a prolisostafina é secretada para o meio extracelular. A clivagem de 211 ácidos aminados (contendo 15 repetições em tandem, compostas por 13 ácidos aminados cada), origina a lisostafina biologicamente ativa (adaptado de BASTOS *et al.*, 2009). aa, ácidos aminados; PS, peptídeo-sinal. As diferentes texturas representam diferentes domínios da proteína.

4.4.2. Estafilococcinas Produzidas por *S. aureus*

Embora os trabalhos sobre as bacteriocinas produzidas por *S. aureus* não sejam muito numerosos, algumas delas têm sido identificadas: estafilococcinas 414, IYS2, 462 e Au-26, Bac1829, BacR1 (ou estafilococcina C55) e aureocinas A53 e A70. Dentre estas bacteriocinas, apenas a estafilococcina C55 e as aureocinas A53 e A70 foram caracterizadas.

Estafilococcina C55/BacR1

A estirpe *S. aureus* C55, isolada de pele, produz uma substância antimicrobiana (SAM) que foi inicialmente purificada através de precipitação com sulfato de amônio e filtração em gel, empregando-se a coluna Sephadex G-100. Esta SAM mostrou-se resistente à ação da temperatura, mantendo sua atividade após 15 min de fervura, e também apresentou atividade entre o pH 4,0 e 8,5. Porém, mostrou-se sensível à ação de enzimas proteolíticas (DAJANI & WANNAMAKER, 1969).

Mais tarde, a natureza da SAM produzida pela estirpe C55 foi reavaliada por Navaratna, Sahl e Tagg (1998), que demonstraram que se tratava de uma bacteriocina, nomeada estafilococcina C55. Esta foi a primeira bacteriocina produzida por *S. aureus* que teve a sua estrutura primária completamente elucidada. Ela também foi a primeira estafilococcina de dois componentes descrita. Estes dois peptídeos, α e β , foram separados através de FPLC ("fast protein liquid chromatography"). As duas frações contendo os peptídeos α e β apresentaram atividade inibitória contra *Micrococcus luteus*. Entretanto, quando estes peptídeos foram combinados, em concentrações equimolares, apresentaram ação sinérgica. A massa molecular destes peptídeos foi determinada: 3.339 Da (α) e 2.993 Da (β). O sequenciamento dos ácidos aminados do terminal amino de ambos os peptídeos revelou a presença de Lan e Melan, sugerindo que se tratava de um lantibiótico de dois componentes (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998).

Os determinantes genéticos da estafilococcina C55 estão presentes em um plasmídeo de aproximadamente 32 kb (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998). Um fragmento de 6.276 pb deste plasmídeo foi clonado, sequenciado e a análise da sequência obtida revelou a presença de quatro ORFs: *sac α* , *sac β* , *sacM1* e *sacT* - FIGURA 5. A sequência dos peptídeos C55 α e C55 β foi consistente com a sequência dos peptídeos codificados pelos genes *sac α* e *sac β* . Embora a estafilococcina C55 tenha se mostrado distinta dos lantibióticos produzidos por SCN, esta bacteriocina apresentou similaridade com a lacticina 3147, uma bacteriocina produzida por *L. lactis*. *sacM1* apresentou homologia com o gene *lanM* e parece codificar uma proteína de 965 ácidos aminados, provavelmente envolvida com as modificações pós-tradução sofridas pelo peptídeo α da estafilococcina C55. *sacT*

codifica uma proteína de 720 ácidos aminados e é homólogo aos genes que codificam os transportadores do tipo ABC, envolvidos no transporte deste tipo de lantibióticos (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1999). Outros genes envolvidos na biossíntese da estafilococcina C55 foram posteriormente sequenciados: *sacM2* e *sacJ* (O'CONNOR *et al.*, 2007). Quando combinadas, as sequências obtidas por Navaratna, Sahl e Tagg (1999) e por O'Connor *et al.* (2007) revelaram que os determinantes genéticos da estafilococcina C55 estão organizados de forma idêntica aos genes que codificam a lacticina 3147. *sacM2* apresenta 40,7% de identidade com *ltnM2*. Assim como *SacM1*, *SacM2* está envolvida com as modificações pós-tradução sofridas pela estafilococcina C55, sendo responsável pelas modificações do peptídeo β (HAVARSTEIN, DIEP & NES, 1995).

A lacticina 3147 é composta por dois peptídeos: *LtnA1*, de 3.306 Da, e *LtnA2*, de 2.847 Da (RYAN *et al.*, 1999). *LtnA1* e a estafilococcina C55 α são variantes naturais, com uma diferença de apenas quatro ácidos aminados entre os dois peptídeos (86% de identidade). Entretanto, o peptídeo *LtnA2* e a estafilococcina C55 β apresentam apenas 55% de identidade. As enzimas de modificação *LtnM1* e *LtnM2* apresentaram 44,7 e 40,7% de identidade com *SacM1* e *SacM2*, respectivamente. *LtnT*, envolvida no transporte da lacticina 3147, apresentou 48,9% de identidade com *SacT*, e *LtnJ* e *SacJ* apresentaram 47% de identidade (O'CONNOR *et al.*, 2007).

O gene *lanJ* raramente é encontrado entre os genes que codificam os lantibióticos. A função deste gene parece estar relacionada com a presença de um resíduo de D-Ala, em uma posição correspondente a um códon de Ser (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998; O'CONNOR *et al.*, 2007).

Análises do gene estrutural da lacticina S (SKAUGEN *et al.*, 1994) e da lacticina 3147 (RYAN *et al.*, 1999) revelaram a presença de códons de Ser na posição nas quais foram detectados resíduos de D-Ala no peptídeo maduro, sugerindo a existência de uma reação de conversão de Ser em D-Ala. O resíduo de Ser presente no pré-peptídeo seria convertido em Dha, pela ação de *LanM*. Uma segunda reação de modificação, catalisada por *LanJ*, estaria relacionada com a conversão de Dha em D-Ala (RYAN *et al.*, 1999).

A *BacR1* foi inicialmente identificada na década de 1970 e foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Bacillus* spp. e algumas bactérias Gram-negativas (*Bordetella* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp. e *Neisseria* spp.). Em 1999, Navaratna, Sahl e Tagg comprovaram que a estafilococcina C55 e a *BacR1* são bacteriocinas idênticas e que esta estafilococcina é amplamente distribuída entre *S. aureus* do fagogrupo II. Os genes envolvidos na biossíntese da *BacR1* também estão presentes em um plasmídeo, o pRW001, associado com a produção da toxina esfoliativa B (WARREN *et al.*, 1974; NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1999).

Aureocina A70

A aureocina A70 é uma bacteriocina pertencente à subclasse IIe, produzida por *S. aureus* A70, isolada de leite comercial. Os determinantes genéticos da aureocina A70 estão localizados em um plasmídeo de 7,9 kb, denominado pRJ6 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990; NETZ *et al.*, 2001; COELHO *et al.*, 2009).

Sequenciamento de DNA e análises genéticas do pRJ6 revelaram a presença de pelo menos duas unidades transcricionais que parecem estar envolvidas com a produção da bacteriocina. O primeiro operon é composto de quatro genes, *aurABCD* (FIGURA 8), que representam os genes estruturais da aureocina A70. Este operon codifica quatro peptídeos pequenos (30-31 resíduos de ácidos aminados), fortemente catiônicos (com *pI* de 9,85 a 10/04) e também altamente hidrofóbicos. Estes peptídeos também têm um teor elevado de pequenos resíduos de ácidos aminados, como Gly e Ala, e nenhum resíduo de Cys. A determinação da massa molecular dos peptídeos purificados revelou que estes peptídeos não são processados. A aureocina A70 é a única bacteriocina de quatro componentes descrita na literatura (NETZ *et al.*, 2001).

A atividade inibitória de cada um dos peptídeos, quimicamente sintetizados, foi testada em meio sólido. Quando as estirpes de *S. aureus* e *Listeria innocua* foram empregadas como indicadoras, somente quando todos os quatro peptídeos foram combinados (25 µg cada), pôde-se observar atividade antimicrobiana. Entretanto, quando *M. luteus* foi empregada como indicadora, os peptídeos AurA, AurB e AurC, testados individualmente (60 µg), exibiram atividade com diferentes eficiências (medida pelo diâmetro da zona de inibição da estirpe indicadora): AurA>AurB>AurC. AurD não apresentou atividade antimicrobiana. A combinação dos quatro peptídeos resultou em zonas de inibição de maior diâmetro, do que as observadas quando os peptídeos foram testados individualmente (BASTOS *et al.*, 2009).

A segunda unidade transcricional contém apenas um gene, *aurT*, que codifica uma proteína de 571 ácidos aminados semelhante ao transportador do tipo ABC envolvido com a exportação da Pep5. Geralmente, os transportadores das bacteriocinas de classe II apresentam um domínio proteolítico responsável pela clivagem do terminal amino (sequência-líder da bacteriocina). Entretanto, nenhum domínio proteolítico foi encontrado em AurT. Este dado foi consistente com a ausência de uma sequência-líder nos componentes da aureocina A70. AurT é essencial para a produção da aureocina A70. O gene que codifica uma proteína acessória, geralmente encontrado no grupamento genético das bacteriocinas de classe II, não foi encontrado no pRJ6 (NETZ *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2009).

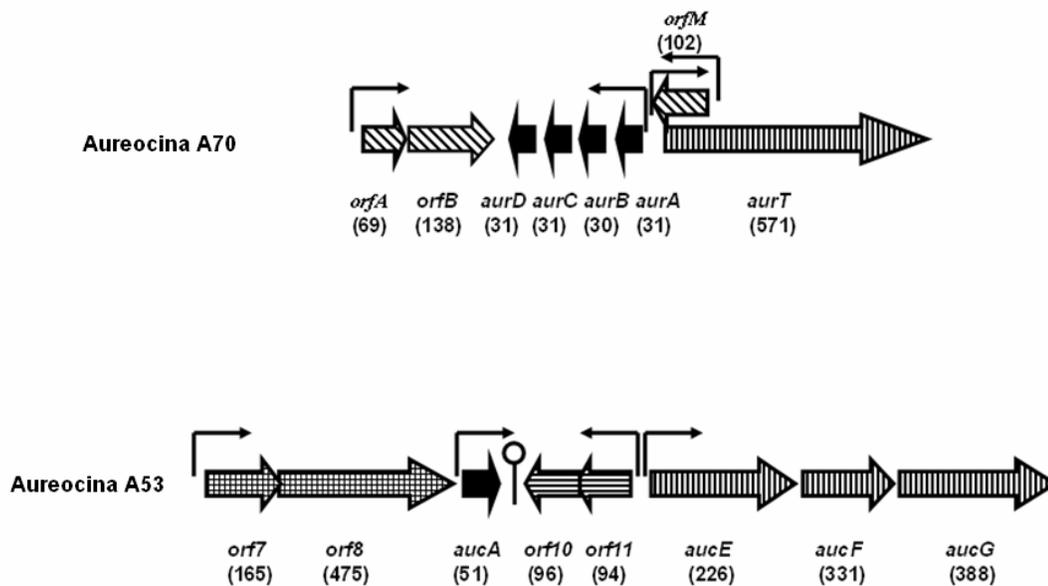


FIGURA 8: Representação esquemática dos genes envolvidos na biossíntese das aureocinas A70 e A53, produzidas por *S. aureus*. Os genes estruturais estão representados pelas setas pretas. Os números indicam o número de ácidos aminados dos polipeptídeos correspondentes. Os promotores estão indicados por setas finas e os terminadores de transcrição por grampos. Os genes que apresentam a mesma função estão representados com a mesma textura. Os genes não estão representados em escala (adaptado de BASTOS *et al.*, 2009).

Um segundo possível operon também foi encontrado no pRJ6 e parece conter duas ORFs: o primeiro gene, *orfA*, parece codificar uma proteína hidrofílica de 69 ácidos aminados semelhante a repressores e a CylR2 (46% de identidade). CylR2 é um peptídeo de 66 ácidos aminados que, juntamente com CylR1, faz parte de um sistema de *quorum sensing* envolvido na regulação de um lantibiótico, com propriedades de citolisina, produzido por *Enterococcus faecalis*. O segundo possível gene, *orfB*, codifica uma proteína hipotética com 138 ácidos aminados, que apresenta um elevado *pI* e um perfil de hidrofobicidade semelhante aos das proteínas associadas com imunidade (NETZ *et al.*, 2001).

Um outro possível gene, *orfM*, foi encontrado próximo aos genes estruturais da aureocina A70 e com capacidade para codificar uma proteína de 102 ácidos aminados e *pI* igual a 10,02. Embora OrfM seja catiônica, como a maioria das proteínas de imunidade, ela não apresenta domínios-transmembrana, comumente encontrados nesta classe de proteínas. Não foi detectada homologia entre OrfB ou OrfM e outras proteínas presentes em bancos de dados. O papel da OrfA, da OrfB e da OrfM em imunidade está sendo investigado (BASTOS *et al.*, 2009).

A aureocina A70 e as suas variantes parecem ser as bacteriocinas mais frequentemente produzidas por estirpes de *S. aureus* Bac⁺, isoladas de diferentes fontes: leite comercial, pacientes e gado bovino saudável ou com mastite (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1998c; GAMON *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2002). A sua produção também tem sido detectada em SCN (NASCIMENTO *et al.*, 2005). A ampla disseminação da aureocina A70 entre *Staphylococcus* spp. está, provavelmente, relacionada com a habilidade do pRJ6 ser mobilizado por plasmídeos conjugativos de *Staphylococcus* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 1998b; COELHO *et al.*, 2009).

Aureocina A53

A aureocina A53 é uma bacteriocina atípica da subclasse IIc, produzida por *S. aureus* A53, também isolado de leite comercial. A aureocina A53 é codificada por um plasmídeo de 10,4 kb, denominado pRJ9 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990).

A sequência nucleotídica completa do pRJ9 foi determinada e foram identificadas 14 ORFs. O primeiro segmento do plasmídeo (nucleotídeos 1-4.256) contém as funções relacionadas com a sua manutenção, enquanto o segundo segmento (nucleotídeos 4.257-10.406) parece conter oito genes envolvidos na produção da aureocina A53, incluindo o seu gene estrutural, *aucA* -FIGURA 8 (NETZ *et al.*, 2002).

A aureocina A53 é um peptídeo altamente catiônico (*pI* de 10,5) de 51 ácidos aminados, contendo dez resíduos de Lys e cinco resíduos de Trp. A aureocina A53 foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca catiônica e HPLC. A análise por espectrometria de massa do peptídeo purificado revelou uma massa

molecular de 6.021,5 Da, 28 Da maior do que a massa predita a partir da sequência do gene estrutural da bacteriocina. Este aumento de massa se deve à presença de um grupamento formil no terminal amino do peptídeo, sugerindo que a aureocina A53 é sintetizada e secretada sem uma sequência-líder, comumente encontrada nas bacteriocinas de classe II. Outras características que distinguem a aureocina A53 das demais bacteriocinas já descritas são: resistência à ação de proteases e estrutura rígida, quando em solução aquosa. Análises por dicroísmo circular revelaram que a aureocina A53 apresenta conformação em folhas β ($18\% \pm 4\%$) e hélice α ($36\% \pm 5\%$) (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990; NETZ *et al.*, 2002).

As ORFs identificadas próximas ao gene estrutural *aucA* mostraram similaridade a genes normalmente encontrados em grupamentos genéticos de bacteriocinas anteriormente descritos. Três delas, *aucE*, *aucF* e *aucG*, constituem um operon, e os seus produtos possuem semelhança com transportadores do tipo ABC, de três componentes. Experimentos de clonagem, utilizando-se hospedeiro heterólogo, revelou a participação destes três genes na imunidade parcial à aureocina A53. Uma vez que nenhum outro transportador foi encontrado no grupamento genético da aureocina A53, presume-se que *aucEFG* também esteja envolvido na secreção desta bacteriocina. Duas ORFs, *orf10* e *orf11*, encontram-se entre o gene *aucA* e o operon *aucEFG*. Elas parecem codificar proteínas de 96 ácidos aminados e 94 ácidos aminados, respectivamente, ambas com funções desconhecidas (NETZ *et al.*, 2002; NASCIMENTO, 2004; BASTOS *et al.*, 2009). Experimentos, visando-se elucidar a função destas ORFs, estão em andamento.

A montante de *aucA*, duas ORFs, *orf7* e *orf8*, são encontradas com uma organização que lembra um operon. Genes homólogos a *orf7* e *orf8* foram encontrados no operon da alanina-racemase. Em *S. aureus*, este operon é essencial para a adição de Ala aos ácidos lipoteicoicos e ácidos teicoicos da parede celular bacteriana. O grau de adição de Ala aos polímeros aniônicos da parede celular determina o total de carga negativa desta estrutura, tendo um impacto significativo sobre a susceptibilidade das bactérias Gram-positivas aos peptídeos catiônicos. Experimentos recentes sugerem que os produtos da *orf7* e da *orf8* não são essenciais para a produção da aureocina A53 em hospedeiro heterólogo (NASCIMENTO, 2004).

Duas novas bacteriocinas similares à aureocina A53 foram descritas: lacticina Z e lacticina Q. A lacticina Z é produzida por *L. lactis* QU, isolada de fezes de cavalo, e apresenta massa molecular de 5.968,9 Da. Já a lacticina Q é produzida por *L. lactis* QU 5, isolada a partir de milho, e sua massa molecular foi determinada em 5.926,50 Da. Ambas as lacticinas apresentaram 46% de identidade com a aureocina A53, são compostas por 53 resíduos de ácidos aminados e apresentam a Met do seu terminal amino formilada (IWATANI *et al.*, 2007, FUJITA *et al.*, 2007).

O modo de ação da aureocina A53 foi investigado tanto em células vivas (contra *S. simulans* 22), como em membranas artificiais. Ela é capaz de permeabilizar a membrana das células sensíveis e sua atividade antibacteriana pôde ser observada em poucos minutos. Concentrações micromolares de aureocina A53 foram necessárias para a sua atividade (NETZ, BASTOS & SAHL, 2002).

5. Aplicações Biotecnológicas das Bacteriocinas

As bacteriocinas favorecem as bactérias produtoras na competição contra outros microrganismos que ocupem um mesmo nicho ecológico (JACK, TAGG & RAY, 1995). Por possuírem um amplo espectro de ação, as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas apresentam potencial para o uso industrial.

A maioria das estafilococinas é capaz de inibir diferentes espécies bacterianas, incluindo vários patógenos, e, portanto, possui potencial de aplicações práticas: na indústria de alimentos, como alternativas aos conservantes químicos, e ainda na prevenção ou no tratamento de infecções bacterianas (TABELAS 3 e 4).

O surgimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos utilizados, tanto na clínica médica como na veterinária, tem tornado essencial o desenvolvimento de novas drogas. As estafilococinas têm se mostrado eficientes na inibição de diversos patógenos humanos e animais, principalmente bactérias Gram-positivas, incluindo estirpes multirresistentes a drogas. Portanto, a utilização desses peptídeos, como alternativa ao uso dos antibióticos, parece ser uma solução atraente (BASTOS *et al.*, 2009).

5.1. Bacteriocinas como biopreservativos de alimentos

A demanda por alimentos seguros está aumentando em todo o mundo. Por isso, têm-se questionado os métodos atualmente utilizados na preservação dos alimentos, uma vez que eles são baseados na adição de compostos potencialmente tóxicos, como nitrato de sódio, nitrito de sódio e sulfitos aos alimentos. Sendo assim, o emprego de bacteriocinas poderia auxiliar a solução de dois importantes problemas enfrentados pela indústria alimentícia: a inibição do crescimento de organismos deteriorantes e a prevenção da veiculação de patógenos, sem a adição de compostos potencialmente tóxicos (COTTER, HILL & ROSS, 2005; BASTOS *et al.*, 2009).

O uso de bacteriocinas na indústria de alimentos pode ajudar a reduzir a adição de preservativos químicos, bem como o uso de tratamentos pela ação do calor, melhor preservando as propriedades naturais dos alimentos e satisfazendo a demanda de consumo de alimentos seguros e minimamente processados (COTTER, HILL & ROSS, 2005; GÁLVEZ *et al.*, 2007).

TABELA 3: Espectro de atividade de estafilococcinas produzidas por *S. aureus*.

| Estafilococcinas | Microrganismos Sensíveis Considerados Relevantes | | |
|---|--|---|--|
| | Bactérias Gram-positivas | Bactérias Gram-negativas e Micobactérias | Referências |
| Aureocina A70 | <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. agalactiae</i> <i>Corynebacterium</i> spp. | | OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1998a NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006 COELHO <i>et al.</i> , 2007 |
| Aureocina A53 | <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Corynebacterium</i> spp. | <i>Moraxella bovis</i> | OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1998c NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006 COELHO <i>et al.</i> , 2007 |
| Estafilococcina C55/BacR1 | <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> spp. | <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | DAJANI & WANNAMAKER, 1969 O'CONNOR <i>et al.</i> , 2007 |
| Bac1829, Estafilococcina C55 | <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus suis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium renale</i> | <i>Haemophilus parasuis</i> <i>Bordetella pertusis</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Moraxella bovis</i> <i>Pasteurella multocida</i> | CRUPPER & IANDOLO, 1996 CRUPPER, GIES & IANDOLO, 1997 MORRIS, LAWSON & ROGOLSKY, 1978 |
| Bac188 | <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>C. diphtheriae</i> | <i>E. coli</i> <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | SAEED <i>et al.</i> , 2004 SAEED <i>et al.</i> , 2006 |
| Estafilococcina IYS2 | <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Actinomyces israeli</i> | - | NAKAMURA <i>et al.</i> , 1983 |

Adaptado de Bastos *et al.* (2009).

TABELA 4: Espectro de atividade de estafilococcinas produzidas por SCN.

| Estafilococcinas | Microrganismos Sensíveis Considerados Relevantes | | |
|---------------------------|---|--|--|
| | Bactérias Gram-positivas | Bactérias Gram-negativas e Micobactérias | Referências |
| Pep5 | <i>S. aureus</i> SCN <i>Corynebacterium</i> spp. | | NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006 FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2006 FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2007 |
| Epidermina | <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. agalactiae</i> <i>Corynebacterium</i> spp. | | NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006 FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2006 FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2007 |
| Galidermina | <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. | <i>Neisseria</i> spp. <i>Moraxella</i> spp. | FURMANEK <i>et al.</i> , 1999 |
| Warnericina RB4 | <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> | | MINAMIKAWA <i>et al.</i> , 2005 |
| Estafilococcina RK | | <i>Legionella pneumophila</i> | HÉCHARD <i>et al.</i> , 2005 |
| Lisostafina | <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> | | CLIMO <i>et al.</i> , 1998 PATRON <i>et al.</i> , 1999 VON EIFF <i>et al.</i> , 2003 WU, KUSUMA & KOKAI-KUN, 2003 |

Adaptado de Bastos *et al.* (2009).

Atualmente, somente a nisina e a pediocina PA-1 são utilizadas industrialmente, principalmente na indústria de vinhos e laticínios (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Em 1933, um peptídeo com atividade antimicrobiana foi descoberto na Nova Zelândia, mas somente em 1947 recebeu o nome de nisina (substância inibitória do grupo N). Este antibiótico foi inicialmente comercializado na Inglaterra, em 1953, e, desde então, o seu uso tem sido aprovado em mais de 50 países, inclusive no Brasil. Em 1969, a nisina foi reconhecida como um produto seguro para o uso em alimentos pelo “Joint Food and Agriculture Organization/ World Health Organization Expert Committee on Food”, mas, somente em 1988, foi classificada como GRAS (“Generally Recognized As Safe”) pelo FDA (“Food and Drug Administration”) (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

A pediocina PA-1 é uma bacteriocina pertencente à subclasse IIa e é produzida pela estirpe *Pediococcus acidilactici* PA-1, apresentando ação contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Embora nenhuma outra bacteriocina já tenha sido licenciada, diversos estudos têm demonstrado o potencial de aplicação de outras bacteriocinas na indústria de alimentos.

As aureocinas A70 e A53 também apresentam atividade antilistéria, sugerindo um potencial de aplicação na preservação de alimentos. Elas parecem ser produzidas constitutivamente e não demandam meios muito ricos, o que diminuiria os custos de produção em larga escala. Estas bacteriocinas são estáveis tanto à temperatura ambiente, como em altas temperaturas (15 min a 80°C ou 5 min a 100°C), não mostrando qualquer diminuição detectável nas suas atividades antimicrobianas sob estas condições. Adicionalmente, apresentam resistência a altas concentrações de sal. As aureocinas A70 e A53 não sofrem modificações após a tradução, para se tornarem ativas, e os genes envolvidos na sua biossíntese apresentam uma organização simples, o que facilitaria a sua clonagem e a sua expressão em bactérias utilizadas nos processos fermentativos para a preparação de alimentos. Através desta abordagem, as aureocinas A70 e A53 seriam produzidas *in situ*, descartando-se a necessidade da adição destes peptídeos ao produto final. Estudos preliminares realizados com a aureocina A53 demonstraram que esta bacteriocina pode ser expressa em estirpes de lactobacilos (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Outra estafilococcina com potencial de uso na indústria de alimentos é a warnericina RB4. Esta bacteriocina apresenta atividade antimicrobiana em pH entre 2,0 e 6,0, contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* (um importante contaminante de sucos de frutas), fazendo da warnericina RB4 uma boa candidata para o controle deste microrganismo na indústria de bebidas, como já foi mencionado anteriormente (MINAMIKAWA *et al.*, 2005).

5.2. Uso de bacteriocinas no tratamento de infecções bacterianas em animais

As estafilococcinas Bac1829, C55 e aureocina A53 são capazes de inibir *Moraxella bovis*, o agente da ceratoconjuntivite infecciosa bovina, sugerindo o seu potencial de aplicação na prevenção ou no controle desta doença (BASTOS *et al.*, 2009).

Outros importantes patógenos animais, tais como *S. aureus*, *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*, também são inibidos pela ação da Bac1829 e da estafilococcina C55 (CRUPPER & IANDOLO, 1996; CRUPPER, GIES & IANDOLO, 1997). A *B. bronchiseptica* e a *P. multocida* agem sinergicamente, causando a rinite atrófica em suínos, uma doença com importante impacto sobre a produção de carne suína (HAESEBROUCK *et al.*, 2004).

A Bac188 apresenta um amplo espectro de atividade, sendo capaz de inibir não só bactérias Gram-positivas, como também bactérias Gram-negativas e fungos, como *Microsporium canis* e *Microsporium gypseum*. Estes microrganismos estão associados a infecções de pele, unhas e pelos nos animais. Outra característica relevante da Bac188, para uso veterinário, é a sua atividade contra o vírus da Doença de New Castle, infectante para quase todas as espécies aviárias e responsável por grandes prejuízos na indústria avícola (SAEED *et al.*, 2004; SAEED *et al.*, 2006).

5.2.1. Uso de bacteriocinas no tratamento da mastite bovina

A mastite bovina consiste de uma inflamação da glândula mamária, usualmente causada por infecção microbiana, que afeta tanto a produção quanto a qualidade do leite, sendo uma das causas mais significativas de perdas econômicas na indústria de laticínios. Calcula-se que um único quarto infectado durante a lactação possa reduzir a produção de leite de uma vaca em 7 a 64% (CARNEIRO *et al.*, 2007). A mastite pode tornar-se crônica, mas a identificação rápida de novos casos pode controlar, ou mesmo prevenir, a infecção de outros animais de um rebanho (BRITO & BRITO, 2000; ZHAO & LACASSE, 2008).

Os sinais da infecção variam de acordo com o animal e a capacidade invasora do patógeno, podendo resultar em mastite clínica ou subclínica (na qual o hospedeiro não apresenta sintomas evidentes da doença). Essa associação provoca visíveis alterações no leite, além de dor e inchaço no úbere do animal (LEIGH, 1999; ZHAO & LACASSE, 2008).

Diferentes patógenos podem causar a mastite bovina, podendo-se destacar os *Streptococcus* spp. (especialmente *S. agalactiae*), SCN e *S. aureus*, sendo este último o seu agente mais prevalente e, uma vez estabelecido nos úberes do animal, a sua erradicação é difícil devido aos diversos fatores de virulência produzidos por esta bactéria (BRITO & BRITO, 2000; CALL, DAVIS & SAWANT, 2008; PYÖRÄLÄ & TAPONEN, 2008; ZHAO & LACASSE, 2008).

O tratamento convencional de gado bovino com mastite ainda é o uso de antibióticos: cefalosporinas, lincosamidas, macrolídeos e, principalmente, penicilinas. Entretanto, tratamentos alternativos, como o uso de plantas medicinais e homeopatia, estão assumindo um importante papel no tratamento destas infecções (BARKEMA *et al.*, 2006).

Os antibióticos podem ser administrados através da sua aplicação intramamária ou ainda através de injeções intramusculares. Mesmo durante o período seco, quando o animal não está produzindo leite, ele continua susceptível a infecções intramamárias. A administração de antibióticos neste período, como medida profilática, tem se mostrado benéfica, levando a uma redução de até 82% do aparecimento de novos casos (HILLERTON & BERRY, 2005).

Tem-se verificado que o uso de antibióticos, como medida profilática ou terapêutica, sem prescrição técnica e sem teste para a identificação do patógeno, tem contribuído para o aumento da resistência dos microrganismos envolvidos. A habilidade de *S. aureus* em sobreviver dentro de neutrófilos e de formar biofilme dificulta ainda mais a cura da mastite (RYAN *et al.*, 1999; BARKEMA *et al.*, 2006).

Os antimicrobianos ou seus derivados metabólicos podem se acumular ou depositar nas células, nos tecidos ou nos órgãos do animal e, quando vestígios dessas substâncias são detectados nos alimentos, são denominados resíduos. A presença de resíduos interfere diretamente na qualidade do leite e nos processos industriais, inibindo culturas lácteas sensíveis, utilizadas na fabricação de queijos e iogurtes e/ou causando alterações na acidificação e na textura destes mesmos produtos, além de constituir um problema de saúde pública. Os resíduos de antimicrobianos podem ter efeito carcinogênico, teratogênico, ou podem ainda causar reações de hipersensibilidade no consumidor (BRITO & BRITO, 2000).

Mesmo o processo de pasteurização, que pode destruir muitos dos microrganismos presentes no leite, não destrói as suas formas esporuladas e as enterotoxinas produzidas por algumas bactérias. Essas toxinas podem causar intoxicação alimentar na população, quando presentes em produtos derivados de leite contaminado. O processo de pasteurização tem pouco ou nenhum efeito sobre o conteúdo de antimicrobianos contidos no leite. O cloranfenicol é completamente resistente ao aquecimento a 100°C e outros antibióticos, tais como a penicilina, a estreptomicina e a tetraciclina, são apenas parcialmente destruídos sob fervura ou aquecimento do leite a 100°C (PEREIRA *et al.*, 1995; BRITO, 2000).

Entre os anos de 2002 e 2004, a prevalência de *S. aureus* resistentes à penicilina variou entre 3% (na França) e 46% (na Inglaterra). A resistência a outros antibióticos, incluindo a oxacilina (reportada somente na França e na Espanha), foi menor do que 10% (CALL, DAVIS & SAWANT, 2008).

Dentre 46 estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina na região Sudeste do Brasil, 67,4% apresentaram resistência à ampicilina, 58,7% apresentaram resistência à

eritromicina, 41,3% apresentaram resistência à tetraciclina e 18 estirpes (39%) mostraram-se resistentes a múltiplos antibióticos (CEOTTO *et al.*, 2009).

Algumas bacteriocinas apresentam ação antagonística contra patógenos causadores de mastite. A nisina é utilizada como um agente ativo em um produto comercializado, o lenço "Wipe-Out", utilizado para a antissepsia das tetas dos animais antes da ordenha (COTTER *et al.*, 2005). Outra bacteriocina utilizada com sucesso na prevenção da mastite durante o período seco é a lacticina 3147, produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* DPC3147, quando associada a seladores de silicone introduzidos nos tetos (RYAN *et al.*, 1998; TWOMEY *et al.*, 2000).

Sete estafilococinas foram testadas contra 165 cepas de *S. aureus* e 74 cepas de *S. agalactiae*, todos envolvidos em mastite bovina, no Brasil ou na Argentina. A epidermina e a aureocina A53 foram capazes de inibir 89% e 77% das estirpes testadas, respectivamente. A aureocina A53 inibiu 91% dos *S. aureus*. A Pep5 inibiu 63% das estirpes de *S. aureus*, mas não inibiu os estreptococos. Quando combinadas, as aureocinas A70 e A53 foram capazes de inibir mais do que 90% de todas as estirpes de *S. aureus* e de *S. agalactiae* testadas. Este sinergismo entre estas bacteriocinas foi mais significativo em relação às estirpes estreptocócicas, uma vez que a combinação das aureocinas A53 e A70 inibiu 92% das estirpes de *S. agalactiae*, mas cada uma isoladamente inibiu apenas 68% e 1,4% das cepas, respectivamente (COELHO *et al.*, 2007).

Devido à sua capacidade de inibir *S. aureus*, a Bac1829 e a estafilococina C55 também poderiam ser empregadas na prevenção ou no tratamento da mastite bovina, embora elas ainda não tenham sido testadas contra patógenos envolvidos nesta doença (BASTOS *et al.*, 2009).

5.3. Uso de bacteriocinas no tratamento de infecções bacterianas em humanos

Diversas estafilococinas são capazes de inibir o crescimento de patógenos humanos. Algumas delas têm um amplo potencial de aplicação clínica, inibindo diferentes microrganismos. Outras são mais específicas, inibindo apenas uma espécie patogênica ou estirpes estreitamente relacionadas com a estirpe produtora (BASTOS *et al.*, 2009).

A estafilococina IYS2 apresentou atividade antimicrobiana contra diferentes bactérias, como *Streptococcus salivarius*, *Propionibacterium acnes* e *Actinomyces israeli* - TABELA 3 (NAKAMURA *et al.*, 1983). *S. salivarius* é a principal bactéria comensal da cavidade oral em humanos, sendo comumente encontrada no trato respiratório superior. Ela parece ser a pioneira na colonização da placa dental, criando condições favoráveis para o estabelecimento de outras bactérias neste ambiente, inclusive microrganismos nocivos à saúde da cavidade oral (GENOSCOPE, 2008).

A. israeli é o agente causador de actinomicose, uma doença caracterizada pela formação de abscessos na boca, nos pulmões, ou órgãos digestivos (BATUR *et al.*, 2006). A utilização da estafilococcina IYS2 em pastas de dente ou antissépticos bucais poderia ajudar a reduzir a população destas bactérias na boca, dificultando a formação de placa dental, de cáries e o risco do desenvolvimento de actinomicose (BASTOS *et al.*, 2009).

Scott e colaboradores (1992) verificaram que uma bacteriocina produzida pela estirpe *S. aureus* 26, a estafilococcina Au-26, foi capaz de inibir o crescimento de lactobacilos isolados de endocérvice uterino. O excesso de lactobacilos nesta região pode acidificar o pH vaginal, causando sintomas similares aos da candidíase (CERIKCIOGLU & BEKSAC, 2004).

A estafilococcina C55 apresentou atividade contra *S. aureus*, incluindo estirpes resistentes à mupirocina e resistentes a múltiplos antibióticos, embora não tenha apresentado atividade contra SCN (BOYCE, 1996). Esta bacteriocina também é capaz de inibir outros importantes patógenos: *E. faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Bordetella pertussis* (MORRIS, LAWSON & ROGOLSKY, 1978; CRUPER, GIES & IANDOLO, 1997).

E. faecalis é uma espécie responsável por 80% das infecções enterocócicas. As bactérias do gênero *Enterococcus* tem sido cada vez mais reconhecidas como importantes agentes das infecções nosocomiais, devido ao aumento da mortalidade causada por estirpes de enterococos multirresistentes aos antibióticos (AMYES, 2007; WERNER *et al.*, 2008).

N. gonorrhoeae é o agente etiológico da gonorréia, a segunda doença mais comumente relatada nos EUA. Diante da emergência de resistência a drogas, particularmente à penicilina, droga de escolha para o tratamento desta doença (CDC, 2007), a descoberta de novas substâncias capazes de inibir estes organismos são necessárias.

Além da estafilococcina C55, a Bac1829 também foi capaz de inibir dois importantes patógenos humanos associados a infecções do trato respiratório: *C. diphtheriae* e *B. pertussis* (CRUPPER & IANDOLO, 1996; CRUPER, GIES & IANDOLO, 1997).

C. diphtheriae é o agente etiológico da difteria, uma doença altamente contagiosa, podendo ser disseminada pelo contato físico direto ou pelo aerossol de secreções dos indivíduos infectados. A difteria tem sido erradicada nas nações desenvolvidas através de uma ampla vacinação. Nos EUA, por exemplo, entre 1980 e 2004, foram notificados 57 casos de difteria (e apenas cinco casos desde 2000). Apesar da baixa incidência, a difteria é uma doença grave, com taxas de letalidade entre 5% e 10%, podendo chegar a 20% entre crianças menores de cinco anos e adultos acima dos 40 anos (ATKINSON *et al.*, 2007). No Brasil, desde o ano 2000, cerca de 50 casos têm sido registrados anualmente (Secretaria de Vigilância em Saúde).

B. pertussis causa a coqueluche, uma doença também considerada altamente contagiosa. Embora não haja relato na literatura descrevendo estirpes de *C. diphtheriae* e de *B. pertussis* resistentes aos fármacos normalmente empregados no tratamento dessas duas doenças, a Bac1829 e a estafilococcina C55 poderiam ser empregadas como alternativas para o controle desses microrganismos (BASTOS *et al.*, 2009).

A Bac188 apresenta potencial de uso no tratamento da tuberculose e de dermatofitoses causadas por fungos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton longifusum*, e *Trichophyton rubrum*) (SAEED *et al.*, 2006).

A tuberculose é uma doença re-emergente, representando um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. O aparecimento de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes está relacionado, principalmente, ao tratamento inadequado dos pacientes e tem contribuído para o espalhamento desta doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Devido a esta preocupante realidade, a procura de novas estratégias de controle e de tratamento da tuberculose é de grande importância e a utilização da Bac188 pode ser uma alternativa potencial. Estudos realizados *in vivo* revelaram que a Bac188 não apresenta efeitos tóxicos em coelhos domésticos saudáveis (SAEED *et al.*, 2006).

A substância antimicrobiana produzida pela estirpe *S. warneri* RK foi capaz de inibir o crescimento de sete estirpes de *Legionella* spp., incluindo duas estirpes de *L. pneumophila*, uma bactéria Gram-negativa responsável por uma grave pneumonia bacteriana chamada doença do legionário (HÉCHARD *et al.*, 2005).

As estafilococcinas epidermina, Pep5 e aureocina A53 apresentaram ação antagonística contra estirpes de SCN e de *S. aureus* envolvidas em infecções nosocomiais (inclusive contra a estirpe de *S. aureus* A22/C, uma estirpe MRSA representante do clone endêmico brasileiro). A epidermina foi capaz de inibir o crescimento de cerca de 40% das estirpes de SCN. Já a Pep5 foi capaz de inibir 77,2%, das estirpes de SCN, incluindo estirpes resistentes à metilina e à mupirocina. Nenhuma das estafilococcinas testadas foi capaz de inibir todas as estirpes empregadas como indicadoras no trabalho, mas a combinação da Pep5 com a aureocina A53 resultou na inibição de todas as estirpes de *S. aureus* isoladas de infecções nosocomiais testadas, sugerindo que as bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp. apresentam um potencial de aplicação, principalmente quando combinadas, no controle de infecções estafilocócicas (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

A epidermina e a Pep5 também se mostraram eficientes na inibição do estabelecimento de estirpes de *S. epidermidis* na colonização de cateteres intravasculares, sendo responsáveis por uma redução de 90% da adesão destas bactérias. Quando os antibióticos vancomicina e rifampicina foram utilizados, combinados, pôde-se observar uma redução de 42% da adesão bacteriana, mostrando-se menos eficientes do que as bacteriocinas (FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2006).

Estirpes de *Corynebacterium* spp., isoladas de infecções associadas a cateteres em hospitais brasileiros, também tiveram a sua adesão a estes dispositivos médicos inibida pela ação da Pep5 e da epidermina - FIGURA 9 (FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2007).

5.3. 1. Bacteriocinas como agentes antineoplásicos

Embora não existam estudos sistemáticos analisando a toxicidade das bacteriocinas em células eucarióticas, alguns trabalhos já foram publicados a este respeito.

O uso de agentes citotóxicos na terapia do câncer é restrito a substâncias que induzem a morte celular, especificamente nas células malignas. Além disso, é desejável que a morte celular seja por apoptose, que ao contrário da necrose, não gera resposta inflamatória (LAGOS *et al.*, 2009).

Quando o efeito citotóxico das colicinas A, E1 e U foi testado sobre fibroblastos humanos normais e transformados, observou-se pouco efeito sobre as células normais e a inibição preferencial de células malignas ou transformadas. Estes resultados sugerem um potencial de aplicação destas colicinas como agentes antineoplásicos, devido a sua toxicidade seletiva para as células malignas (CHUMCHALOVA & SMARDA, 2003).

As bacteriocinas nisina A e pediocina PA-1/AcH também apresentaram atividade citotóxica contra células neoplásicas SV40-HC, isoladas de cólon humano (MURINDA, RASHID & ROBERTS, 2003).

A MccE492 é uma microcina produzida pela estirpe *Klebsiella pneumoniae* RYC492, possui 7.887 Da e tem por modo de ação a formação de canais de íons nas células-alvo. Além de possuir atividade antimicrobiana contra vários membros da família Enterobacteriaceae, esta bacteriocina tem efeito citotóxico sobre diferentes linhagens de células humanas: HeLa, derivada de carcinoma cervical; Jurkat, células T derivadas de leucemia aguda, e RJ2.25, variante de linfoma (LAGOS *et al.*, 2009).

O efeito citotóxico da MccE492 parece ser mediado por interações específicas com as células transformadas, uma vez que esta bacteriocina não agiu sobre linhagens de células saudáveis, células KG-1 (macrófagos) e células endoteliais (LAGOS *et al.*, 2009).

Quando empregada em concentrações entre 5 a 10 µg/ml, a MccE492 induziu a apoptose de células HeLa, através da ativação de caspases, perda do volume celular, fragmentação do DNA, exposição extracelular da fosfatidilserina e perda do potencial de membrana mitocondrial. Quando empregada em concentrações superiores a 20 µg/ml, a MccE492 induziu a necrose das células-alvo (LAGOS *et al.*, 2009).

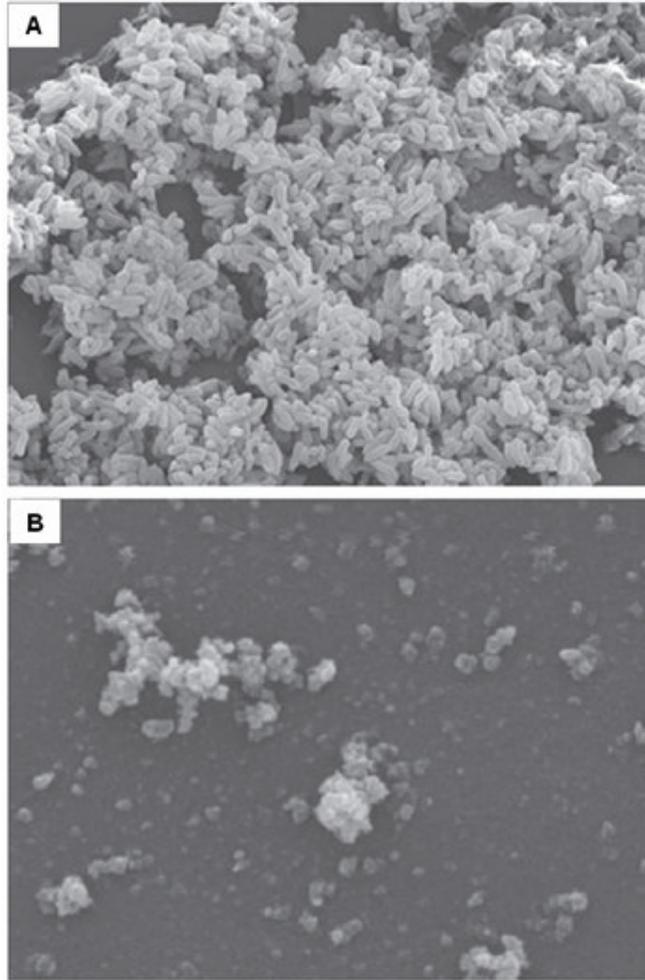


FIGURA 9: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a adesão da estirpe *Corynebacterium* spp. 633544 a cateteres de silicone. A, Cateter não tratado; B, cateter tratado com a Pep5 (FONTANA, BASTOS & BRANDELLI, 2007).

Testes pré-clínicos foram realizados, empregando-se a MccE492 no tratamento de carcinoma humano gerado em camundongos. Os resultados preliminares destes testes foram encorajadores, revelando uma clara atividade antitumoral desta bacteriocina. Testes de farmacodinâmica e farmacocinética estão em andamento (LAGOS *et al.*, 2009).

5.4. Uso de bacteriocinas no controle de fitopatógenos

As bacteriocinas também podem ser utilizadas no combate a fitopatógenos. O uso de bacteriocinas produzidas por endossimbiontes pode ser considerado uma alternativa para o biocontrole de patógenos de plantas, reduzindo assim o perigo associado ao uso de pesticidas sintéticos. Formulações válidas para garantir a efetividade da bacteriocina sob condições ambientais precisam ser mais amplamente estudadas e, por fim, desenvolvidas. Já foram descritas bacteriocinas com atividade contra *Erwinia amylovora*, um patógeno que causa uma típica doença necrótica que acomete as plantas da família Pomoideae, em especial, as macieiras e as pereiras, e é um dos maiores problemas na produção destas frutas (VANNESTE, YU & BEER, 1992; JABRANE *et al.*, 2002).

A bacteriocina produzida pela estirpe *Pseudomonas syringae* mostrou-se eficiente no combate à doença do nó da oliveira, causada pelas estirpes *P. syringae* subsp. *savastanoi* PVBa229 e PVBa304, em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* (LAVERMICOCCA *et al.*, 2002).

CAPÍTULO I: Purificação e caracterização da simulancina 3299

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

A simulancina 3299 é uma bacteriocina produzida pela estirpe *S. simulans* 3299, isolada de gado bovino com mastite. Esta bacteriocina apresenta uma atividade antagonística significativa contra *S. agalactiae* envolvidos nesta doença (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Por esta razão, o objetivo deste primeiro capítulo foi purificar e caracterizar a simulancina 3299.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS

1. Determinar as melhores condições de produção da simulancina 3299.

Abordagem experimental: cinética de produção da simulancina 3299.

2. Purificar a simulancina 3299.

Abordagens experimentais: obtenção da bacteriocina a partir do sobrenadante da cultura da estirpe *S. simulans* 3299, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca catiônica e HPLC.

3. Caracterizar molecularmente a simulancina 3299.

Abordagens experimentais: determinação da massa molecular da simulancina 3299, através de espectrometria de massa MALDI-TOF, e determinação da sequência de ácidos aminados, através de degradação de Edman.

4. Identificar o gene estrutural da simulancina 3299.

Abordagens experimentais: desenho de oligonucleotídeos iniciadores, baseado na sequência de ácidos aminados determinada; amplificação por PCR; clonagem e sequenciamento do amplicon obtido.

5. Localizar os determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299.

Abordagem experimental: amplificação, por PCR, da região entre os genes *nukM* e *nukT*, empregando-se o plasmídeo pRJ97 como molde.

6. Analisar a organização genética relativa à simulancina 3299.

Abordagens experimentais: desenho de oligonucleotídeos iniciadores, com base na sequência dos genes envolvidos na biossíntese da nukacina ISK-1, visando a amplificação das regiões de dois genes adjacentes de cada vez; amplificação por PCR; clonagem e sequenciamento dos amplicons obtidos, além das análises *in silico* das sequências obtidas.

7. Determinar o modo de ação da simulancina 3299.

Abordagem experimental: cinética de atividade da simulancina 3299.

8. Determinar as propriedades da simulancina 3299.

Abordagens experimentais: determinação da sensibilidade a enzimas proteolíticas, ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299 e ação do pH sobre a estabilidade da simulancina 3299.

9. Analisar a influência de sais na produção da simulancina 3299.

Abordagens experimentais: determinação da cinética de crescimento, contagem das células viáveis da estirpe 3299 e análise da produção da bacteriocina, em meio GM17 e meio GM17 acrescido de sais, além de análise estatística dos resultados obtidos.

10. Analisar a expressão do gene estrutural da simulancina 3299.

Abordagens experimentais: obtenção de RNA da estirpe *S. simulans* 3299, síntese do cDNA e RT-PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Estirpes e condições de crescimento

No trabalho descrito no CAPÍTULO I desta tese, foram empregadas as estirpes: *S. simulans* 3299 (NASCIMENTO *et al.*, 2005), produtora da simulancina 3299, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, sabidamente sensível a esta bacteriocina, e *Escherichia coli* DH5- α (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989), empregada em experimentos de clonagem. A estirpe *S. simulans* 3299 foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Aparecida Vasconcelos de Paiva Brito, da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

As estirpes *S. simulans* 3299 e *M. luteus* ATCC 4698 foram cultivadas nos meios TSB [*Tryptone Soy Broth* (Oxoid)], BHI [*Brain Heart Infusion* (Difco)] ou GM17 [M17 (Difco), suplementado com 5% (p/v) de glicose], a 37°C por 18 h. Elas foram estocadas em meio TSB com 40% (v/v) de glicerol (Merck), a -20°C. *E. coli* DH5- α foi cultivada em meio LB (Himedia) e estocada em meio LB acrescido de 40% (v/v) de glicerol, também a -20°C.

Os meios de cultura foram utilizados nas formas líquida, sólida [acrescidos de ágar a 1,5% (p/v)] ou semissólida [acrescidos de ágar a 0,7% (p/v)].

2. Teste de atividade da simulancina 3299

A atividade da simulancina 3299 foi determinada tanto através de teste de difusão em ágar, como em meio líquido, em placa de microdiluição.

2.1. Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado em placas contendo meio TSB (COELHO *et al.*, 2007). Foram feitos poços de 6 mm de diâmetro em 20 ml de TSB sólido cobertos com 3 ml de meio TSB semissólido, contendo 0,3 ml da estirpe indicadora, *M. luteus* ATCC 4698 (cultivada por 18 h, a 37°C, em 5 ml de caldo TSB), diluída 10 vezes em solução salina [NaCl 0,85% (p/v)]. Em seguida, 40 μ l das diluições duplas e seriadas da simulancina 3299, preparadas em tampão fosfato de sódio (pH 5,8), foram adicionados a cada poço. Após secar, as placas foram incubadas a 37°C, por 18 h.

A atividade antimicrobiana foi definida com base na maior diluição da bacteriocina responsável pela inibição da estirpe indicadora, multiplicada por 25 (a fim de se obter o valor correspondente a 1 ml), e expressa em unidades de bacteriocina (UB) por ml: UB/ml.

2.2. Teste de microdiluição

A atividade da simulancina 3299 também foi testada através de microdiluição em placas de poliestireno (TPP®92096), conforme descrito por Bastos *et al.* (2009). A estirpe indicadora, *M. luteus* ATCC 4698, foi cultivada por 18 h, a 37°C, em 5 ml de meio GM17 e diluída em GM17 (DO₆₀₀ de 0,05). Cada poço continha 100 μ l de diluições duplas e seriadas

da simulancina 3299, preparadas em meio GM17, e 100 µl da bactéria indicadora diluída. As placas foram incubadas por 18 h, a 37°C. O crescimento foi medido com um leitor de placas de microdiluição (Multiscan Ascent Labsystems, Helsinki, Finlândia), a 600 nm. A atividade antimicrobiana foi definida com base na maior diluição de simulancina 3299 responsável pela inibição de pelo menos 50% do crescimento da estirpe indicadora, comparado com o do controle sem bacteriocina, multiplicada por 10 (a fim de se obter o valor correspondente a 1 ml), e expressa em UB/ml.

3. Cinética de produção da simulancina 3299

A fim de se definir as condições ótimas para a produção da simulancina 3299, a estirpe *S. simulans* 3299 foi cultivada em dois meios distintos: GM17 e BHI, devido a sua influência na produção de bacteriocinas (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Inicialmente, a estirpe 3299 foi crescida em 5 ml de caldo BHI e em 5 ml de GM17, a 37°C por 18 h. A cultura foi diluída em 100 ml do mesmo meio (BHI ou GM17), até se alcançar a DO₆₀₀ de 0,05, e , então, incubada a 37°C, sob agitação (180 rpm). A cada duas horas, duas alíquotas de 1 ml de cultura foram coletadas. Uma das alíquotas foi centrifugada (12.100 x *g* por 10 min, a 4°C). O sobrenadante da cultura foi esterilizado por filtração com membranas (Millipore, com poros de 0,45 µm) e a produção da simulancina 3299 foi determinada através de teste de atividade em placa de microdiluição (item 2.2). A produção da bacteriocina foi analisada por 12 h. A segunda alíquota de 1 ml foi utilizada para o acompanhamento do crescimento bacteriano, através da determinação da DO₆₀₀ em um espectrofotômetro (Shimadzu - UV 160).

4. Purificação da simulancina 3299

A purificação da simulancina 3299 foi realizada através das seguintes etapas: obtenção da bacteriocina no sobrenadante da cultura da estirpe *S. simulans* 3299, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca catiônica e HPLC.

A atividade antimicrobiana de cada uma das frações obtidas foi testada em placa de microdiluição (item 2.2).

4.1. Obtenção da simulancina 3299 no sobrenadante

A simulancina 3299 foi purificada a partir de 1 litro de cultura da estirpe *S. simulans* 3299, cultivada nas melhores condições de produção desta substância (item 3). Em seguida, a cultura foi centrifugada a 12.100 x *g* por 20 min, a 4°C, e as células foram descartadas. O sobrenadante obtido foi mantido a 4°C, até o momento do uso.

4.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

Para a purificação da simulancina 3299, o sobrenadante obtido anteriormente (item 4.1) foi submetido a uma cromatografia de interação hidrofóbica, empregando-se para isto a resina “Amberlite XAD-16” (Supelco), conforme descrito por Brede *et al.* (2004).

Foram utilizados 50 g de resina, distribuídos em quatro erlenmeyers distintos, cada um deles contendo 12,5 g. Inicialmente, a resina foi ativada com metanol: 25 ml para cada 12,5 g de resina. Em seguida, a resina foi lavada, duas vezes, com 50 ml de água Milli-Q estéril. Após a lavagem com água, 250 ml de sobrenadante foram adicionados a cada um dos erlenmeyers, que foram incubados à temperatura ambiente, sob agitação (200 rpm), por 1,5 h. Após este período, o sobrenadante foi recolhido e foram adicionados 100 ml de água Milli-Q estéril a cada um dos erlenmeyers, que foram novamente incubados sob agitação (200 rpm). Após 30 min, a água foi recolhida e a resina foi novamente lavada com mais 100 ml de água, nas mesmas condições. Em seguida, cada erlenmeyer recebeu 50 ml de 20% (v/v) de isopropanol/10 mM de HCl (pH 2,0) e foi incubado à temperatura ambiente, sob agitação (200 rpm), por 20 min. Todo o líquido foi coletado e a cada erlenmeyer foram adicionados 25 ml de 70% (v/v) de isopropanol /10 mM de HCl (pH 2,0). Os erlenmeyers foram incubados sob agitação (200 rpm). Após 60 min, todo o líquido foi coletado e a resina foi armazenada, conforme recomendado pelas instruções do fabricante. A fração contendo a bacteriocina foi submetida à cromatografia de troca catiônica.

4.3. Cromatografia de troca catiônica

Uma cromatografia de troca iônica foi realizada com o produto obtido na etapa anterior (item 4.2), conforme descrito por Brede *et al.* (2004). Para esta etapa, 10 ml da resina “SP Sepharose Fast Flow” (GE Healthcare) foram utilizados. Inicialmente, a resina foi lavada com 10 ml de água Milli-Q estéril e equilibrada com 30 ml de ácido acético 10 mM (Merck). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 30 ml de tampão fosfato de sódio pH 5,8, 10 ml de NaCl 0,1 M, 30 ml de NaCl 1 M e 10 ml de NaCl 5 M, para a eluição da bacteriocina. O eluato foi recolhido em frações de 10 ml. A resina foi armazenada conforme recomendado pelas instruções do fabricante. As frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram utilizadas para a HPLC.

4.4. HPLC

A purificação por HPLC foi realizada em um aparelho “Äkta Purifier System” (Amersham Pharmacia Biotechnology), conforme descrito por Brede *et al.* (2004). A eluição do peptídeo foi efetuada em um gradiente de água e isopropanol [0-100% (Merck)], contendo ácido trifluoroacético [TFA, 0,1% (v/v), Merck] e acompanhada a 214 nm.

As amostras foram novamente submetidas a uma cromatografia de interação hidrofóbica, tendo sido aplicadas em uma coluna “Resource RPC 1-ml” (Amersham

Pharmacia Biotechnology). Foram eluídas frações de 1 ml, a uma velocidade de 1 ml/min. As frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram submetidas a uma segunda cromatografia na coluna “Sephasil Peptide C₈” (Amersham Pharmacia Biotechnology) e o eluato foi recolhido em frações de 500 µl, a uma velocidade de 500 µl/min.

5. Caracterização molecular da simulancina 3299

A caracterização molecular da simulancina 3299 purificada foi realizada através da determinação da sua massa molecular e do sequenciamento dos seus ácidos aminados, em colaboração com o Dr. Morten Skaugen (“Norwegian University of Life Sciences”).

5.1. Determinação da massa molecular

A massa molecular da simulancina 3299 foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF em um aparelho Voyager-RP DE (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), conforme descrito por Brede *et al.* (2004). O aparelho foi utilizado no modo positivo, com 25 kV de aceleração. A matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicianímico (2020, Sigma) foi dissolvida em uma mistura 1:1 de acetonitrila e TFA 0,1% (v/v), até 15 mg/ml. Em seguida, 0,5 µl da amostra e 1,5 µl da matriz foram misturados, secados e os espectros obtidos foram registrados no modo linear. O espectrômetro foi calibrado seguindo as instruções do fabricante (Applied Biosystems).

5.2. Sequenciamento dos ácidos aminados

O sequenciamento dos ácidos aminados do terminal amino do peptídeo foi determinado por degradação de Edman, com um sequenciador automático 447A (Applied Biosystems), conforme descrito por Brede *et al.* (2004).

6. Cinética de atividade da simulancina 3299

Para a análise da cinética de atividade da simulancina 3299, a cultura de *S. simulans* 3299 foi cultivada em 10 ml de meio de cultura, nas melhores condições de produção desta substância (item 3). Em seguida, 10 ml da cultura foram centrifugados a 12.100 x *g* por 20 min, a 4°C. As células foram descartadas, 4 g de sulfato de amônio [40% (p/v), Merck] foram adicionados ao sobrenadante obtido e a precipitação foi realizada a 4°C, durante pelo menos 2 h. Após este período, a mistura foi centrifugada a 31.000 x *g* por 20 min, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco e, em seguida, diluído em 1 ml de água Milli-Q estéril, visando-se a obtenção da bacteriocina 10 vezes concentrada. A atividade antimicrobiana foi testada contra a indicadora *M. luteus* ATCC 4698 em placa de microdiluição (item 2.2).

A estirpe indicadora foi crescida por 18 h, em 5 ml de meio GM17, a 37°C. Após este período, 1 ml da cultura foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e as células foram colocadas em suspensão em meio GM17. A esta suspensão, foram adicionadas 1.024 UB e meio GM17, a fim de se alcançar um volume final de 400 µl (DO₆₀₀ de 1,2).

As placas de microdiluição (“honeycomb”) foram incubadas a 37°C, em um aparelho “Bioscreen C” (OY Growth Curves, Finlândia), capaz de ler automaticamente a DO. A cinética de atividade da simulancina 3299 foi acompanhada por 8 h, com leituras a cada 15 min, com 5 s de agitação antes de cada leitura. A suspensão celular (DO₆₀₀ de 1,2) sem a adição da simulancina 3299 foi empregada como controle.

7. Determinação das condições ótimas de atividade da simulancina 3299

A atividade da simulancina 3299 foi determinada sob diferentes temperaturas e valores de pH, conforme descrito por Maldonado, Ruiz-Barba e Jiménez-Díaz (2004), empregando-se a bacteriocina semipurificada.

Após a cromatografia de interação hidrofóbica, o isopropanol foi evaporado e a bacteriocina concentrada foi armazenada a -20°C, até o momento do uso. O peptídeo foi dissolvido em tampão fosfato de sódio pH 5,8 para a determinação da sensibilidade a enzimas proteolíticas e o teste da ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299. Para a realização do teste de ação do pH sobre a estabilidade da simulancina 3299, o peptídeo foi dissolvido em água Milli-Q estéril.

Após a realização dos testes, a bacteriocina foi diluída e a sua atividade testada, através do método de difusão em ágar (item 2.1), contra *M. luteus* ATCC 4698. Em todos os testes, foi empregado um controle que não recebeu tratamento.

7.1. Determinação da sensibilidade a enzimas proteolíticas

A sensibilidade da bacteriocina à ação das enzimas tripsina (Sigma; 10 mg/ml), protease XXIII (Sigma; 10 mg/ml) e proteinase K (Sigma; 10 mg/ml) foi testada. As enzimas foram preparadas em Tris 0,05 M - CaCl₂ 0,01 M (pH 7,0) e foram empregadas 800 UB em cada um dos testes.

A solução contendo a simulancina 3299 semipurificada (180 µl) foi tratada com 20 µl de cada uma das enzimas proteolíticas (completando um volume final de 200 µl), por 4 h a 37°C. Um controle contendo 180 µl da solução da simulancina 3299 semipurificada e 20 µl de tampão Tris/CaCl₂ (a fim de se obter o mesmo volume das soluções tratadas, 200 µl) foi empregado.

7.2. Ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299

A ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299 foi testada empregando-se 1.600 UB em cada um dos testes. A simulancina 3299 foi submetida a tratamento a 100°C e 121°C (autoclavação), separadamente, por 15 min.

7.3. Ação do pH sobre a estabilidade da simulancina 3299

A ação do pH sobre a atividade da simulancina 3299 foi testada empregando-se 400 UB em cada um dos testes.

O pH da solução contendo a simulancina 3299 foi ajustado, pela adição de HCl (0,12 M) ou NaOH (0,1 M), para 3,0, 6,0 (controle), 9,0 e 11,0. A bacteriocina foi mantida nestas condições durante 2 h, à temperatura ambiente, e, em seguida, o pH foi novamente ajustado para 6,0.

8. Efeito da concentração de sais sobre a produção da simulancina 3299

A fim de se analisar o efeito da concentração de sais sobre a produção da simulancina 3299, a produção desta bacteriocina foi testada na presença de NaCl (0,7 e 2,1 M), KCl (0,7 e 2,1 M) e CaCl₂ (200 mM).

8.1. Cinética de crescimento da estirpe *S. simulans* 3299

A estirpe 3299 foi crescida em 5 ml de meio GM17 a 37°C, por 18 h, sob agitação (180 rpm). Após este período, a cultura foi diluída em: 10 ml do meio GM17, 10 ml de meio GM17 acrescido de NaCl (0,7 M), 10 ml de meio GM17 acrescido de NaCl (2,1 M), 10 ml de meio GM17 acrescido de KCl (0,7 M), 10 ml de meio GM17 acrescido de KCl (2,1 M) e 10 ml de meio GM17 acrescido de CaCl₂ (200 mM), até se alcançar a DO₆₀₀ de 0,05. A partir de cada um destes inóculos, 200 µl foram utilizados para a determinação da cinética de crescimento da estirpe *S. simulans* 3299 em um aparelho "Bioscreen C" (DO₆₀₀). A DO foi determinada, automaticamente, pelo aparelho a cada 30 min, durante 24 h.

8.2. Contagem das células viáveis

A partir da mesma cultura diluída (item 8.1), 5 ml foram incubados a 37°C, sob agitação (180 rpm). Após 24 h, as células viáveis em cada uma das condições de cultivo foram diluídas (até 10⁻⁹) em solução salina; 100 µl de cada uma das diluições foram semeados em meio GM17 sólido e as placas foram incubadas a 37°C, por 18 h. Após este período, as colônias foram contadas.

8.3. Análise da produção da simulancina 3299

A partir de 5 ml de cultura obtidos (item 8.2), após 24 h de crescimento da estirpe 3299, uma alíquota de 1 ml foi centrifugada (12.100 x g, por 10 min). As células foram

descartadas e o sobrenadante foi esterilizado por aquecimento (100°C, 15 min), uma vez que a bacteriocina mostrou-se resistente a este tratamento. A atividade da simulancina 3299, produzida em cada uma das condições de crescimento, foi quantificada em placa de microdiluição (item 2.2).

8.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa R 2.9.0 (“R Foundation for Statistical Computing”). Como os resultados não apresentaram distribuição normal, foram realizados testes não paramétricos. As unidades formadoras de colônia (UFC) e a atividade da simulancina 3299 foram analisadas separadamente. Foram feitos os testes: Kruskal-Wallis, para se comparar todas as condições de cultivo, e Mann-Whitney, comparando-se os meios acrescidos de sal com o meio GM17, considerando-se $p < 0,05$.

9. Obtenção de DNA plasmidial

9.1. Isolamento de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi isolado com o sistema comercial “Qiaprep® Spin Miniprep Kit” (Qiagen). Para o isolamento de DNA plasmidial da estirpe *S. simulans* 3299, uma etapa adicional de lise foi realizada. A estirpe 3299 foi crescida em 5 ml de meio GM17 a 37°C, por 18 h. Inicialmente, os 5 ml de cultura foram centrifugados (12.100 x *g*, por 5 min) e as células foram lavadas com tampão TE (Tris/ HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 7,8). Em seguida, as células foram colocadas em suspensão em 250 µl tampão de lise P1, fornecido pelo sistema comercial. Foram adicionados 50 µl de lisostafina (Sigma; 1mg/ ml, preparada em água Milli-Q) e a suspensão foi incubada a 37°C. Após 30 min, o isolamento do DNA plasmidial foi realizado seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

9.2. Eletroforese em gel de agarose

A preparação de DNA plasmidial foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,7% [(p/v), Sigma] preparada em tampão TAE (Tris/ acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,4), a 60 V, por 4 h (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989). Foram utilizados 30 µl da preparação de DNA e 5 µl de corante para eletroforese [glicerol 50% (p/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v); xilenocianol 0,02% (p/v); EDTA 10 mM, pH 7,5]. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (EtBr, 1 µg/ml, Sigma), visualizado em um aparelho transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat) e registrado por um sistema de imagens (Vilber Lourmat Doc-Print 001.SD).

Quando necessário, a banda contendo o DNA plasmidial foi recortada do gel de agarose e o DNA foi purificado, a fim de se garantir a ausência de DNA cromossômico na preparação.

9.3. Purificação do DNA plasmidial a partir do gel de agarose

A purificação do DNA plasmidial a partir do gel de agarose foi realizada empregando-se o sistema comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O produto obtido foi armazenado a 4°C e foi empregado como molde em reações de PCR.

10. Isolamento de DNA genômico

O DNA genômico foi isolado conforme descrito por Potter *et al.* (2009).

As culturas foram crescidas em 10 ml de caldo TSB e incubadas por 18 h, a 37°C. As células foram colhidas após centrifugação a 12.100 x *g* por 10 min e lavadas em 2 ml de tampão TE. Em seguida, as células foram colocadas em suspensão em 900 µl de tampão TE e distribuídas em dois microtubos. Foram, então, adicionados 20 µl de lisostafina (1 mg/ml, preparada em água Milli-Q) e 20 µl de lisozima (Sigma; 1 mg/ml, preparada em água Milli-Q). A suspensão celular foi incubada a 37°C, por 1 h. Após este período, a suspensão foi tratada com 55 µl da solução de protease XXIII (Sigma; 1 mg/ml, preparada em água bidestilada estéril), 15 µl de SDS a 20% (p/v) e 10 µl da solução de RNase A (Sigma; 10 mg/ml, preparada em água bidestilada estéril). A preparação foi novamente incubada a 37°C por 2 h. Após este período, a preparação foi tratada com 600 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), à temperatura ambiente, misturando-se as duas fases. Após 15 min, a preparação foi centrifugada a 12.100 x *g*, por 4 min. A fase aquosa foi coletada e tratada com 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A preparação foi centrifugada a 9.200 x *g*, por 4 min. A fase aquosa foi coletada e novamente tratada com 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico. A fase aquosa foi coletada e o DNA foi precipitado com 50 µl de solução de acetato de sódio 3 M (pH 7,0) e 1 ml de etanol absoluto gelado, a -20°C, por 18 h. Após este período, a preparação foi centrifugada a 12.100 x *g*, por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi novamente lavado com 300 µl de etanol gelado [70%, (v/v)], centrifugando-se a 12.100 x *g*, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento secado por 10 min. O DNA foi então dissolvido em 100 µl de água bidestilada estéril e estocado a 4°C, até o momento do uso.

11. PCR

Os genes envolvidos na biossíntese da simulancina 3299 foram detectados por PCR.

Cada reação de PCR continha: 50 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores empregados, 2,5 U de *Taq*-polymerase (Promega), 1X tampão de reação de PCR (Promega), 5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato utilizado e 50 ng de DNA. A amplificação foi feita em um “Programmable Thermal Controller” (PTC-100™, MJ Research, USA), através de uma etapa inicial de desnaturação a 92°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 1 min a 92°C, 46-50°C por 1 min (anelamento), ajustada de acordo

com as propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 min a 72°C (extensão) e uma etapa final de extensão a 72°C, por 5 min (CEOTTO *et al.*, 2009). Foram utilizados como molde DNA genômico (item 10) ou DNA plasmidial (item 9.1), aproximadamente 50 ng.

Para a identificação do gene estrutural da simulancina 3299, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base nos resultados obtidos a partir do sequenciamento dos ácidos aminados desta bacteriocina. Para a detecção dos demais genes envolvidos na biossíntese da simulancina 3299, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base na sequência dos genes envolvidos na produção da nukacina ISK-1, obtida no “GenBank” (número de acesso: AB125341).

Os amplicons, obtidos por PCR, foram observados em géis de agarose 1,4% (p/v), preparados em tampão TAE. Foram utilizados 15 µl do produto da amplificação e 5 µl de corante para eletroforese. Um padrão de DNA (“100-bp DNA ladder”, Promega) foi utilizado como marcador de tamanho molecular. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V durante uma hora. O gel foi corado em solução de EtBr e os fragmentos amplificados foram visualizados em um aparelho transiluminador de luz UV e registrados por um sistema de imagens.

12. Quantificação de ácidos nucleicos

Todos os ácidos nucleicos purificados, empregados neste trabalho, foram quantificados pelo equipamento NanoDrop-ND1000-Spectrophotometer (Saveen Werner), conforme as instruções do fabricante.

13. Clonagem

Os amplicons de interesse foram purificados, clonados e sequenciados.

13.1. Purificação dos amplicons

Os amplicons foram purificados com o sistema comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), conforme as instruções do fabricante.

13.2. Ligaçã

Os amplicons purificados e dosados (item 12) foram ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega), também conforme as instruções do fabricante.

13.3. Preparo das células competentes de *E. coli* DH5α

As células de *E. coli* DH5α foram cultivadas em 5 ml de caldo LB a 37°C, por 18 h, sob agitação (120 rpm). Foram inoculados 2,5 ml desta cultura em 50 ml do mesmo meio, que foi novamente incubado a 37°C, a 120 rpm, por mais 2 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 9.200 x *g* por 10 min, em tubos de centrífuga previamente gelados. As

células foram suspensas em 25 ml de $MgCl_2$ 0,1 M também gelado e incubadas por 10 min, no gelo. As células foram centrifugadas a $9.200 \times g$ por 10 min e suspensas em 25 ml de $CaCl_2$ 0,1 M gelado. As células foram novamente centrifugadas a $9.200 \times g$ por 10 min, suspensas em 1,25 ml de $CaCl_2$ 0,1 M gelado contendo glicerol a 14 % (v/v) e foram novamente incubadas no gelo por 20 min. As células foram armazenadas em alíquotas de 100 μ l em microtubos estéreis, a $-70^\circ C$, até o momento do uso (MESSING, 1983).

13.4. Transformação das células competentes de *E. coli* DH5 α

Foram acrescidos 10 μ l do produto da ligação (item 13.2) a uma alíquota de células competentes de *E. coli* DH5 α (100 μ l). Esta mistura permaneceu no gelo por 45 min e foi submetida a um choque térmico a $42^\circ C$ por 2 min. Em seguida, 1 ml de caldo LB foi adicionado à mistura, que foi incubada a $37^\circ C$ por 2 h, a 120 rpm. Foram semeados 100 μ l da suspensão bacteriana em quatro placas contendo meio LB acrescido de ampicilina (75 μ g/ml, preparada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH8,0), IPTG (40 μ g/ml, preparado em água) e X-Gal (75 μ g/ml, preparado em dimetilformamida e estocado ao abrigo da luz), que foram incubadas por 18 h a $37^\circ C$ (MESSING, 1983).

As colônias brancas, provavelmente contendo o inserto, foram cultivadas em 10 ml de caldo LB acrescido de ampicilina, por 18 h a $37^\circ C$. Esta cultura foi utilizada para a extração de DNA plasmidial (item 9.1). O DNA purificado foi eluído em 100 μ l de água livre de nucleases, contida no sistema, e utilizado para se confirmar a presença do inserto e para o sequenciamento do fragmento de interesse.

13.5. Análise dos transformantes obtidos

O DNA plasmidial dos transformantes (50 ng) foi empregado como molde para a amplificação do fragmento clonado, por PCR (item 11), visando a detecção da presença do inserto.

14. Sequenciamento do fragmento clonado

Seis clones foram sequenciados para cada um dos insertos. O sequenciamento dos fragmentos desejados foi realizado no laboratório do Dr. Ingolf Nes ("Norwegian University of Life Sciences"), em sequenciador automático, modelo 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento continha 1 μ l do DNA do vetor contendo o inserto desejado (aproximadamente 200 ng), 0,35 μ l do oligonucleotídeo iniciador empregado [3,2 pmol; pUC/M13 "forward" ($5'$ GTTTTCCAGTCACGAC $3'$), ou pUC/M13 "reverse" ($5'$ CAGGAAACAGCTATGAC $3'$)], 6,15 μ l de água Milli-Q e 2,5 μ l do sistema comercial "ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems). Ambas as fitas do inserto foram sequenciadas.

15. Análises *in silico* das sequências de DNA

As análises das sequências nucleotídicas foram realizadas através dos programas:

- ✓ "ClustalW2™" (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>),
- ✓ "NEBcutter V2.0" (New England Biolabs, www.neb.com).
- ✓ "Blastn" ("National Center for Biotechnology Information" – NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov),
- ✓ "Web Map Preferences" (pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_ma),
- ✓ "Translate" (ExPASy Proteomics Server, <http://ca.expasy.org>),
- ✓ "InterProScan™" (ExPASy Proteomics Server, <http://ca.expasy.org>) e
- ✓ "Blast Conserved Domains" (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

16. Análise da transcrição do gene estrutural da simulancina 3299

A análise da transcrição do gene estrutural da simulancina 3299 foi realizada através de RT-PCR (adaptado de STRAUME *et al.*, 2007).

16.1. Obtenção de RNA

A estirpe *S. simulans* 3299 foi crescida em 5 ml de caldo GM17 e incubada por 8 h, a 37°C. Aproximadamente 10⁹ células foram colhidas após centrifugação a 12.100 x *g* por 10 min, a 4°C, e lavadas em 2 ml de tampão TE livre de RNases. Em seguida, as células foram colocadas em suspensão em 700 µl de tampão TE, também livre de RNases. Foram, então, adicionados 25 µl de lisostafina (40 mg/ml, preparada em água bidestilada estéril) e 20 µl de lisozima (10 mg/ml, preparada em água bidestilada estéril). A suspensão celular foi incubada a 37°C, por 30 min. Após este período, o isolamento do RNA foi realizado empregando-se o sistema comercial "RNeasy" (Qiagen), conforme as instruções do fabricante.

O RNA foi dissolvido no tampão RDD [fornecido pelo sistema comercial "RNase-Free DNase Set" (Qiagen)] e tratado com 20 U da DNase I livre de RNases (Invitrogen), por 30 min à temperatura ambiente, a fim de se garantir a ausência de DNA na preparação. Após este período, a solução foi tratada com 100 µl de fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugada a 12.100 x *g* por 2 min, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e o RNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado, a -20°C por 18 h. Após este período, a preparação foi centrifugada a 12.100 x *g* por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi novamente lavado com 300 µl de etanol gelado a 70% (v/v), centrifugando-se a 12.100 x *g* por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento secado por 10 min a 45°C, em um "SpeedVac Concentrator" (SPD2010-Savant). O RNA foi, então, dissolvido em 20 µl de água Milli-Q, livre de RNases e estocado a -70°C, até o momento do uso.

16.2. Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado empregando-se o sistema comercial "SuperScript™ III Reverse Transcriptase" (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante, e 500 ng de RNA como molde (dosado conforme descrito no item 12).

16.3. RT-PCR

A RT-PCR foi realizada conforme descrito no item 11, empregando-se 100 ng de RNA (dosado conforme descrito no item 12) como molde. Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados. O primeiro par foi utilizado para a detecção do mRNA correspondente ao gene estrutural da simulancina 3299 (item 11). O segundo par foi utilizado para a detecção do mRNA do gene *gyrA* ("housekeeping") de *S. aureus*. Para o desenho desses oligonucleotídeos iniciadores, as sequências do gene em questão, de diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., foram comparadas e os iniciadores foram desenhados a partir de regiões conservadas do gene *gyrA*.

RESULTADOS

1. Cinética de produção da simulancina 3299

A cinética da produção da simulancina 3299 foi determinada nos meios BHI e GM17, por 12 h (FIGURA 10).

Entre 6 e 8 h, a estirpe 3299 apresentou maior crescimento em meio GM17 do que em meio BHI. Após 6 h, a DO_{600} observada foi de aproximadamente 1,5 e 4,0 nos meios BHI e GM17, respectivamente. Uma diferença menos marcante foi detectada após 8 h de crescimento: DO_{600} de aproximadamente 3,0, em meio BHI e 4,0, em meio GM17. Entretanto, após 10 e 12 h, o crescimento da estirpe 3299 mostrou-se similar nos dois meios de cultura (DO_{600} de aproximadamente 5,0 e 6,0, respectivamente).

A produção da simulancina 3299 começou a ser detectada após 6 h de crescimento da estirpe 3299 e apresentou um aumento proporcional nos dois meios de cultura. Após 6 h, quando o crescimento da estirpe 3299 havia sido mais acentuado em meio GM17, foram detectadas 20 UB/ml, em meio BHI, e 40 UB/ml, em meio GM17. Entre 8 e 12 h, quando o crescimento da estirpe 3299 foi similar nos dois meios testados, pôde-se detectar a produção máxima desta bacteriocina: em meio BHI, a estirpe 3299 produziu 40 UB/ml, e, em meio GM17, foram produzidas 80 UB/ml.

Uma vez que a produção de simulancina 3299 foi duas vezes maior em meio GM17 e alcançou o seu máximo após 8 h de crescimento, estas condições foram selecionadas para as etapas seguintes deste trabalho.

2. Purificação e caracterização molecular da simulancina 3299

Após cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca catiônica e duas corridas de HPLC, a simulancina 3299 foi purificada a partir do sobrenadante da cultura da estirpe *S. simulans* 3299, cultivada em 1 litro de GM17, a 37°C, por 8 h.

O sobrenadante da cultura da estirpe 3299 continha um total de 320.000 UB. Após a cromatografia de interação hidrofóbica, foram recuperadas 128.000 UB (40%), em 100 ml de isopropanol 70%, que foram submetidas à cromatografia de troca catiônica. O eluato foi recolhido em frações de 10 ml e a bacteriocina foi eluída, predominantemente, nas duas primeiras frações de NaCl 1 M (em um total de 51.200 UB). Estas duas frações (20 ml) foram submetidas à HPLC. As frações 11, 12 e 13 da segunda HPLC (FIGURA 11), com um volume de 500 µl cada, apresentaram maior atividade antimicrobiana, 25.600 UB/ml, 51.200 UB/ml e 12.800 UB/ml, respectivamente. Isso significa que 87,5% da bacteriocina, aplicada nas colunas de HPLC, foram recuperados. Portanto, estas frações foram empregadas para a determinação da massa molecular e para o sequenciamento dos ácidos aminados.

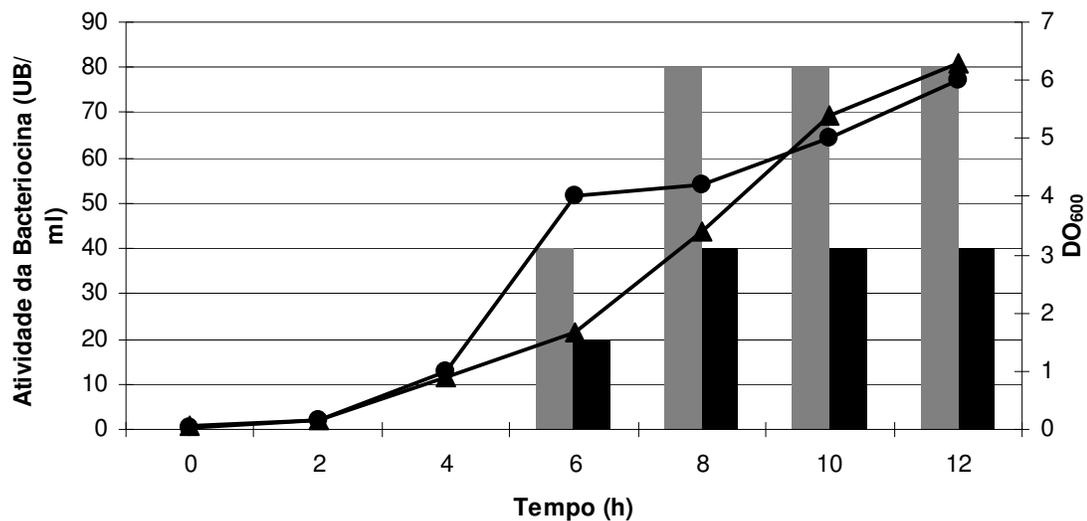


FIGURA 10: Cinética de produção da simulancina 3299 nos meios BHI e GM17. Barras pretas, atividade de bacteriocina produzida em meio BHI; barras cinzas, atividade de bacteriocina produzida em meio GM17. Em ambos os casos, a estirpe indicadora empregada foi *M. luteus* ATCC 4698. ▲, curva de crescimento de *S. simulans* 3299 em meio BHI; ●, curva de crescimento de *S. simulans* 3299 em meio GM17. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.

A massa molecular da simulancina 3299 foi estimada em 2.957,3 Da (FIGURA 11) e o sequenciamento do peptídeo revelou apenas uma pequena sequência, de sete ácidos aminados: KKKSGVI, correspondentes ao terminal amino do peptídeo. O sequenciamento foi bloqueado depois do sétimo ácido aminado (I).

3. Identificação do gene estrutural da simulancina 3299

A análise dos sete primeiros ácidos aminados presentes no peptídeo maduro da simulancina 3299 revelou identidade com a nukacina ISK-1, um lantibiótico produzido pela estirpe *S. warneri* ISK-1, isolada de um “nukadoko”, no Japão (SASHIHARA *et al.*, 2000).

Com base na sequência do gene estrutural da nukacina ISK-1 depositada no “GenBank” (número de acesso: AB125341), foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores nukAF e nukAR (TABELA 5), a fim de se detectar, por PCR, o gene estrutural desta bacteriocina, *nukA*, na estirpe *S. simulans* 3299. O DNA genômico da estirpe 3299 foi utilizado como molde nesta reação.

Um fragmento de 195 pb, correspondente ao amplicon esperado, foi amplificado (FIGURA 12). O amplicon obtido foi clonado no vetor pGEM T-Easy e transferido para *E. coli* DH5- α . O DNA plasmidial de seis transformantes, contendo o inserto desejado, foi isolado e o seu inserto foi sequenciado. As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa “ClustalW2™”. Comparações entre a sequência do gene estrutural da nukacina ISK-1 e a sequência-consenso gerada, também pelo programa “ClustalW2™”, revelaram uma sequência idêntica ao gene *nukA*. Sendo assim, pôde-se concluir que a simulancina 3299 e a nukacina ISK-1 são codificadas por genes estruturais idênticos e que, portanto, a simulancina 3299 é um lantibiótico de 27 ácidos aminados do subtipo All, pertencendo à família da lacticina 481.

4. Localização dos determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299

A produção de bacteriocina geralmente está associada à presença de plasmídeos nas células bacterianas. Entretanto, os genes que codificam algumas bacteriocinas estão localizados no cromossomo da estirpe produtora (JACK, TAGG & RAY, 1995).

A estirpe *S. warneri* ISK-1, produtora da nukacina ISK-1, possui dois plasmídeos, o pPI-2, com 2,5 kb (ASO *et al.*, 2005a), e o pPI-1, com 30,2 kb, no qual se encontram localizados os genes envolvidos na biossíntese deste lantibiótico (SASHIHARA *et al.*, 2000). A estirpe *S. simulans* 3299 também apresenta dois plasmídeos, um com 3,5 kb e o segundo >25 kb (NASCIMENTO *et al.*, 2005), designado pRJ97.

A fim de se determinar a localização dos genes relacionados com a produção da simulancina 3299, os oligonucleotídeos iniciadores nukM2 e nukT1 (TABELA 5) foram utilizados para se amplificar a região intergênica entre *nukM* (que codifica uma enzima

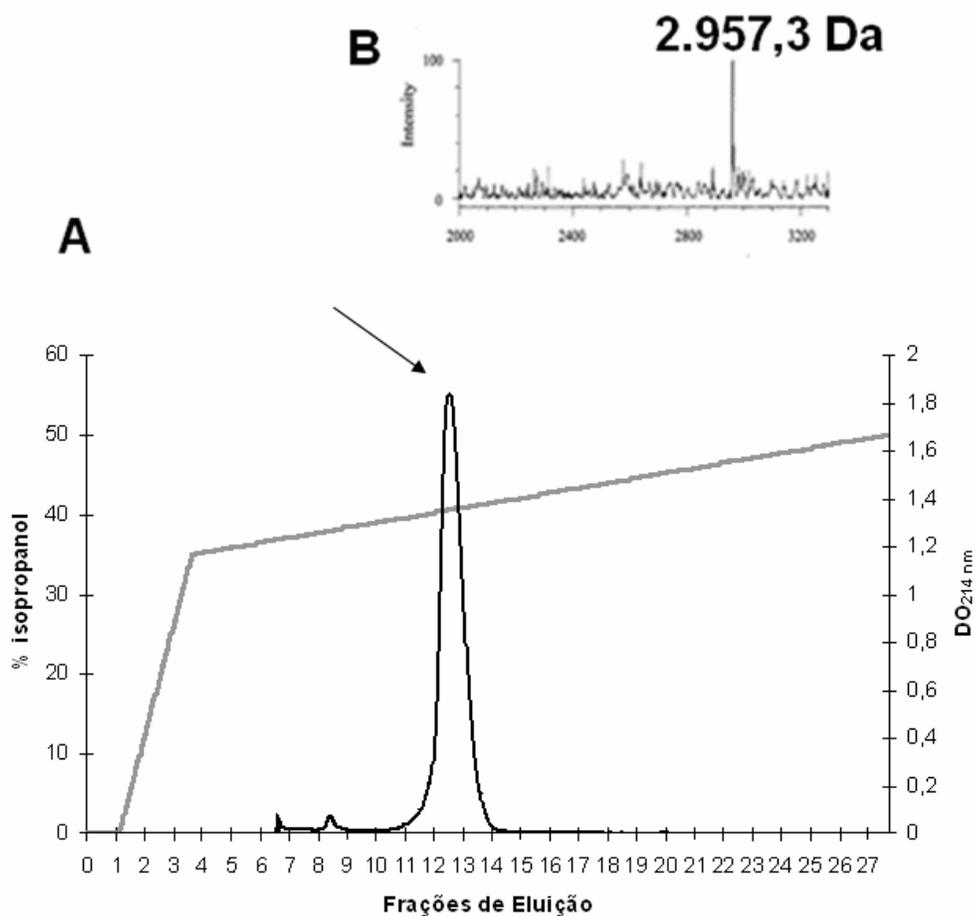


FIGURA 11: Purificação e caracterização molecular da simulancina 3299. A, eluição da simulancina 3299 em um gradiente de água e isopropanol (0 a 100%), contendo TFA 0,1%, após HPLC na coluna “Sephasil Peptide C₈”, acompanhada a 214 nm. B, Espectrometria de massa MALDI-TOF. A seta indica as frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana e foram empregadas para a determinação da massa molecular e para o sequenciamento dos ácidos aminados da bacteriocina. Linha cinza, concentração de isopropanol.

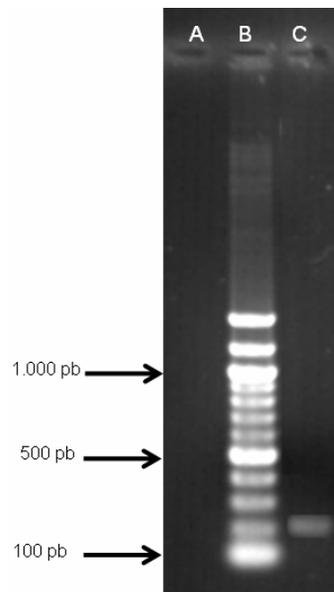


FIGURA 12: Detecção do gene *nukA* por PCR. Gel de agarose a 1,4% (p/v) mostrando o produto de amplificação do gene *nukA*, submetido a uma corrida eletroforética por 1 h a 90 V. A, reação empregando-se o pRJ9 como molde (controle negativo); B, padrão “100-pb DNA ladder”; C, amplificação do gene *nukA*, empregando-se o DNA total da estirpe 3299 como molde. Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

envolvida na modificação da nukacina ISK-1) e *nukT* (que codifica uma proteína envolvida no processamento e no transporte deste lantibiótico). O plasmídeo pRJ97 purificado, a partir do gel de agarose, foi empregado como molde.

O amplicon esperado deveria possuir 686 pb e um fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondente à região entre os genes *nukM* e *nukT*, foi detectado (FIGURA 13), demonstrando que os determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299 estão localizados no plasmídeo pRJ97.

5. Organização genética relativa à simulancina 3299

Os determinantes genéticos dos lantibióticos podem estar organizados sob a forma de operons. Análises comparativas desses genes sugerem que se tratam de sequências conservadas envolvidas em funções similares (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001). Por isso, a organização dos genes envolvidos na biossíntese da simulancina 3299 foi investigada.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base na sequência dos genes envolvidos na biossíntese da nukacina ISK-1, obtida no “GenBank” (número de acesso: AB125341), visando-se à amplificação das regiões de dois genes adjacentes de cada vez: *orf1* e *nukA*, *nukA* e *nukM*, *nukM* e *nukT*, *nukT* e *nukF*, *nukF* e *nukE*, *nukE* e *nukG*, e *nukG* e *nukH* (TABELA 5). O DNA genômico da estirpe 3299 foi empregado como molde.

Os amplicons correspondentes às regiões entre os genes *nuk* foram detectados em todas as PCR realizadas (FIGURA 14). Estes resultados sugerem que os genes envolvidos na produção da simulancina 3299, localizados no pRJ97, encontram-se na mesma ordem dos determinantes genéticos da nukacina ISK-1, localizados no plasmídeo pPI-1. Entretanto, o amplicon correspondente à região intergênica entre *orf1* e *nukA* apresentou aproximadamente 1.350 pb, enquanto o amplicon esperado seria de 755 pb (TABELA 6).

Os genes relacionados à produção da simulancina 3299 serão doravante chamados *sim*. A sequência correspondente ao gene *simA* foi depositada no “GenBank” (número de acesso: GQ380548).

5.1. Clonagem e sequenciamento de DNA

O amplicon correspondente à região entre os genes *orf1* e *simA* (aproximadamente 1.350 pb) foi clonado no vetor pGEM T-Easy e transferido para *E. coli* DH5- α . O DNA plasmidial de seis transformantes, contendo o inserto desejado, foi isolado e ambas as fitas do fragmento foram sequenciadas. As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa “ClustalW2TM” e uma sequência-consenso foi gerada. As sequências de DNA obtidas foram reunidas e submetidas a análises *in silico*.

TABELA 5: Oligonucleotídeos iniciadores empregados para a detecção dos genes *nuk*.

| Genes ou Regiões a Serem Amplificados | Oligonucleotídeos Iniciadores | Tm | Tamanho do Amplicon Esperado (pb) |
|---------------------------------------|--|------|-----------------------------------|
| <i>nukA</i> | "Forward": nukAF 5' AGGAGGTAACAAACATGG ^{3'} | 46°C | 525 |
| | "Reverse": nukAR 5' CCCCTTTTATGAACAACAAG ^{3'} | 49°C | |
| <i>orf1 - nukA</i> | "Forward": nukAF 5' AGGAGGTAACAAACATGG ^{3'} | 46°C | 755 |
| | "Reverse": Orf1 5' CTTATCTAGGGTATTTTTGGC ^{3'} | 59°C | |
| <i>nukA - nukM</i> | "Forward": nukM1 5' CGTTCCTCAGGAGTATTTCC ^{3'} | 50°C | 782 |
| | "Reverse": nukAR 5' CCCCTTTTATGAACAACAAG ^{3'} | 49°C | |
| <i>nukM - nukT</i> | "Forward": nukM2 5' GCGTCATGGGAAATTTAC ^{3'} | 49°C | 686 |
| | "Reverse": nukT1 5' GGAAAATCGCTCTTAGGATC ^{3'} | 50°C | |
| <i>nukT - nukF</i> | "Forward": nukT2 5' CTCATAAGTCACCATCTAG ^{3'} | 47°C | 656 |
| | "Reverse": nukF1 5' GGATCTAAGCCGTTAGTAG ^{3'} | 49°C | |
| <i>nukF - nukE</i> | "Forward": nukF2 5' GGCTAATACAGTAGGTATC ^{3'} | 47°C | 839 |
| | "Reverse": nukE1 5' CTCCTACTAATGCTGATAC ^{3'} | 48°C | |
| <i>nukE - nukG</i> | "Forward": nukE 5' GTAACAGGAGGGATGTTG ^{3'} | 48°C | 657 |
| | "Reverse": nukG1 5' CTATCCAACCTATAAAGTCC ^{3'} | 48°C | |
| <i>nukG - nukH</i> | "Forward": nukG2 5' GGTTGGATAGGTACAGCAT ^{3'} | 49°C | 550 |
| | "Reverse": nukH1 5' GCAGATGATATTAAGTATAGAG ^{3'} | 50°C | |

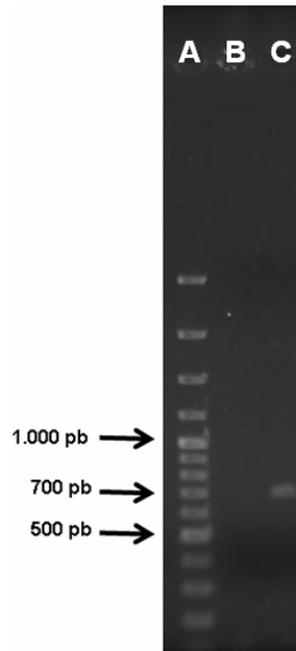


FIGURA 13: Localização dos determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299 por PCR. Gel de agarose a 1,4% (p/v) mostrando o produto de amplificação da região intergênica entre *nukM* e *nukT*, submetido a uma corrida eletroforética por 1 h a 90 V. A, padrão “100-pb DNA ladder”; B, reação empregando-se o plasmídeo pRJ9 como molde (controle negativo); C, amplificação empregando-se o plasmídeo pRJ97 como molde. Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

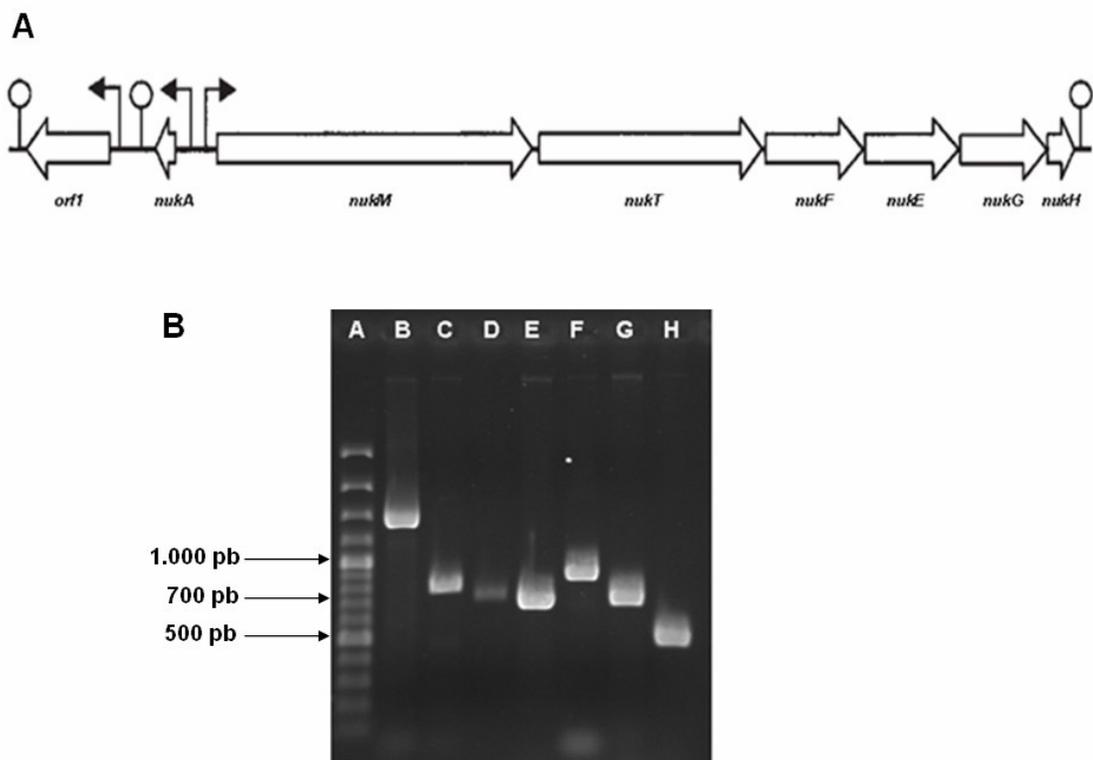


FIGURA 14: Organização genética relativa à simulancina 3299, analisada por PCR. A, organização genética relativa à nukacina ISK-1 (adaptado de ASO *et al.*, 2004b). B, gel de agarose 1,4% (p/v) mostrando os produtos de amplificação submetidos a uma corrida eletroforética por 1 h a 90 V: A, padrão “100-pb DNA ladder”; amplificação da região intergênica entre: B, *orf1* e *nukA*; C, *nukA* e *nukM*; D, *nukM* e *nukT*; E, *nukT* e *nukF*; F, *nukF* e *nukE*; G, *nukE* e *nukG*; e H, *nukG* e *nukH*. Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

TABELA 6: Análise da organização genética da simulancina 3299, por PCR.

| Região Amplificada | Tamanho Esperado (pb) | Tamanho Aproximado dos Fragmentos Obtidos (pb) |
|---------------------------|------------------------------|---|
| <i>orf1 e nukA</i> | 755 | 1.350 |
| <i>nukA e nukM</i> | 782 | 800 |
| <i>nukM e nukT</i> | 686 | 750 |
| <i>nukT e nukF</i> | 656 | 650 |
| <i>nukF e nukE</i> | 839 | 800 |
| <i>nukE e nukG</i> | 657 | 700 |
| <i>nukG e nukH</i> | 550 | 500 |

5.2. Análises *in silico*

A análise da sequência nucleotídica de ambas as fitas da região entre os genes *orf1* e *simA*, com os programas "ClustalW2TM" e "NEBcutter V2.0", mostrou que o fragmento apresenta 1.449 pb e um sítio para a enzima de restrição *EcoRI* (FIGURA 15).

Uma única ORF, capaz de codificar um polipeptídeo com 224 ácidos aminados, foi encontrada na sequência nucleotídica através de análises com o programa "Web Map Preferences". A montante desta ORF, está presente uma sequência RBS (AGGAG) e as regiões -35 (TTGCCA) e -10 (TATAAT) do promotor do tipo σ^{70} . A região -35 está localizada no terminal esquerdo, onde se encontra uma das repetições invertidas de um elemento IS (FIGURA 16).

Análises realizadas com o programa "Blastn" revelaram que a ORF encontrada apresenta 97% de identidade com genes que codificam as transposases dos elementos IS257/431 presentes em *S. aureus* MuHM RSA6129, *S. epidermidis* RP62A, *S. haemolyticus* MuHM RSH9307 e *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC15305.

A ORF encontrada foi traduzida pelo programa "Translate" (FIGURA 16). Análises com os programas "InterProScanTM" e "Blast Conserved Domains" revelaram que a transposase presente na IS257/431, identificada no presente trabalho, apresentou similaridade com famílias *rve* de integrases e de transposases 11, 12 e *mut*.

O elemento IS257/431, encontrado entre os genes *orf1* e *simA*, possui 791 pb, repetições invertidas de 17 pb, 33% de C+G e 67% de A+T. A ORF identificada, correspondente ao gene da transposase (675 pb), encontra-se na mesma direção dos genes *orf1* e *simA* (FIGURA 17). A sequência do elemento IS encontrado foi depositada no "GenBank" (número de acesso: GQ380549).

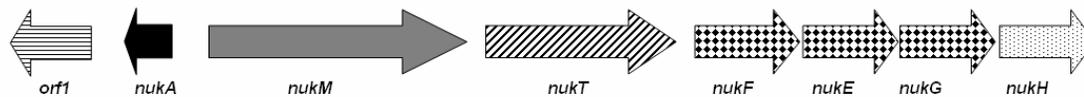
A inserção dos elementos IS257/431, geralmente, causa uma duplicação de 8 pb no sítio-alvo (MAHILLON & CHANDLER, 1998). Porém, essa duplicação não foi encontrada na sequência analisada.

O alinhamento das sequências da região intergênica entre *orf1* e *simA/nukA*, presente na estirpe *S. simulans* 3299 (sem a sequência de inserção) e na estirpe *S. warneri* ISK-1, realizado pelo programa "ClustalW2TM" (FIGURA 18), revelou uma diferença de 97 pb, sugerindo que a inserção da IS257/431 causou uma deleção no pRJ97, a partir da posição 443 da região entre os genes *orf1* e *simA*, na estirpe 3299. Além disso, pôde-se também observar oito substituições de pares de bases do tipo transição e duas substituições de pares de bases do tipo transversão, nesta região intergênica, além da deleção de 1 pb e da inserção também de 1 pb.

AGGAGGTAACAAACATGGAAAATTCTAAAAGTTATGAAGGACATTGAAGTAGCAAATTTATTAGAAGAGGTTCAAGAAGATGAA
TTGAATGAAGTCTTAGGAGCTAAGAAAAAGTCAGGAGTAATCCCAACTGTGTCACACGATTGCCATAT**GAATTC**TTTCCAATT
TGTATTTACTTGTGTTTCATAAAAAATGGGAATGTGTAAAAATCAGTAAAAATAACTTCAAGTGATACTTACTTTAGTTTTTTA
TTGATTAACATGATACTAACAATTATGGCATGGCGAAAATCCGTAGTTTTGAAAAGAGCTACGGATTTTTTATGAACCGTAAAA
CATATATAGTGTCTTTAGTTATTGTATTTGGAGAATATTGAAACCTTAATATTTTGTCTTTCCAGCTTTTATTAAGATAAC
TTCATCGAAGGCAATTTATTGGCAACAAGGTTCTGTTGCCAAGTTGAATTTATAGTATAATTTTAAATAAAAAAGGAGTCTTTG
TATGAACTATTTTCAGATATAACAATTTAACAAGGATGCTATCACTGTAGCCGTTGGCTACTATCTAAGATATGCATTGAGTT
ATCGTGATATATCTGAAATATTAAGGGAACGTGGTGTAACGTTTCATCATTCAACGGTCTACCGTTGGGTTCAAGAATATGCC
CCGATTTTATATCAAATTTGGAAGAAAAAGCATAAAAAAGCTTATTACAAATGGCGTATTGATGAGACGTACATCAAAATAAA
AGGAAAATGGAACATTTTATATCGTGCCATTGATGCAGAGGGACATACATTAGATATTTGGTTGCGTAAGCAACGAGATAATC
ATGCAGCATATGTATTTATCAAACGTCTCATTAAACAATTTGGTAAACCTCAAAGGTAATTACAGATCAGGCACCTTCAACG
AAGGTAGCAATGGCTAAAGTAATTAAGCTTTTTAACTTAAACCTGACTGTCAATGTACATCGAAATATCTGAATAATCTCAT
TGAGCAAGATCACCGTCATATTAAGTAAGAAAGACAAGATATCAAAGTATCAATACGGCAAAGAATACTTTAAAAGGTATTG
AATGTATTTATGCTCTATATAAAAAAGAACCGCAGGTCCTTCAGATCTACGGATTTTCGCCATGCCACGAAATTAGGCATATG
TTAGCCAGTTAAGGAAAAACGACAGAATAAAATGGTAATTAGCTATATTTTCTAACTTTGCAACAGAACCAAAAATGTGAT
ACATTAATGAAGTGAGGTTGGTTTTAATTTTTTATCGATAAAGGAATGGGAAGCATTGATTTTATGAAGAAAATAAATACTAT
TATTATAGACGATAATGCAACTACTAGAGAGGATTTAAAAGTAAATCTATCTTACTTCTCATTGTTTCATGTAAAGGTACAT
TTAGTGAATATATTGAAGCCAAAAATACCTAGATAAG

FIGURA 15: Sequência nucleotídica do fragmento contendo a região entre os genes *orf1* e *simA*, presente no plasmídeo pRJ97. Em negrito e sublinhado, destaca-se o sítio para a enzima *EcoRI* (GAATTC).

Nukacina ISK-1



Simulancina 3299

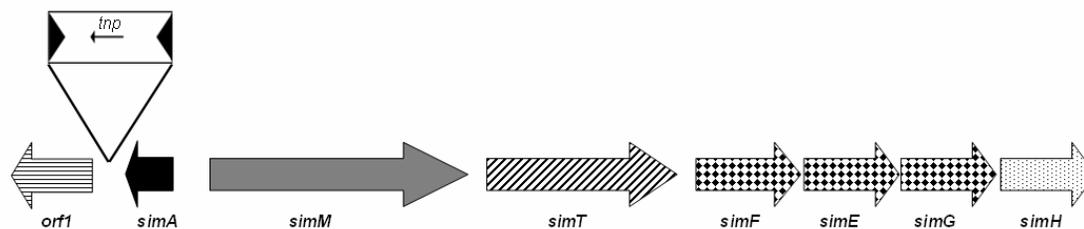


FIGURA 17: Representação das organizações genéticas relativas à simulancina 3299 e à nukacina ISK-1. Os genes estruturais, *nukA* e *simA*, estão representados em preto, a IS257/431 está representada sob a forma de retângulo e os demais genes envolvidos na biossíntese da nukacina ISK-1 e da simulancina 3299 estão representados com diferentes texturas de acordo com a sua função. As setas indicam a direção de transcrição dos genes. Os genes que apresentam a mesma função estão representados com a mesma textura. Os genes não estão representados em escala.

```

                                simA →
pRJ97      AGGAGGTAACAAACATGGAAAATTCTAAAGTTATGAAGGACATTGAAGTAGCAAATTTAT 60
pPI-1      AGGAGGTAACAAACATGGAAAATTCTAAAGTTATGAAGGACATTGAAGTAGCAAATTTAT 60
          *****
          RBS                                nukA →

pRJ97      TAGAAGAGGTTCAAGAAGATGAATTGAATGAAGTCTTAGGAGCTAAGAAAAAGTCAGGAG 120
pPI-1      TAGAAGAGGTTCAAGAAGATGAATTGAATGAAGTCTTAGGAGCTAAGAAAAAGTCAGGAG 120
          *****

pRJ97      TAATCCCAACTGTGTACACGATTGCCATATGAATTCTTTCCAATTTGTATTTACTTGT 180
pPI-1      TAATCCCAACTGTGTACACGATTGCCATATGAATTCTTTCCAATTTGTATTTACTTGT 180
          *****

pRJ97      GTTCATAAAAATGGGAATGTTGTAATAATCAGTAAAAATAACTTCAAGTGATACTTACTTT 240
pPI-1      GTTCATAAAAAGGGGAATGTTGTAATAATCAGTAAAAATAACTTCAAGTGATACTTACTTT 240
          *****

pRJ97      AGTTTTTT-ATTGATTAACATGATACTAACATTATGGCATGGCGAAAAATCCGTAGTTTTG 299
pPI-1      AGTTTTTTTATTGATTAACATGATACTAATATTATGGCATGGCGAAAAATCCGTAGTTTTG 300
          *****

pRJ97      AAAAGAGCTACGGATTTTTTATGAACCGTAAAACATATATAGTGTCTTTAGTTATTGTAT 359
pPI-1      AAAAGAACTACGGATTTTTTATGAACCGTAAAACATATATAGTGTCTTTAGTTATTGTAT 360
          *****

pRJ97      TTTGGAGAATATTGAAACCTTAATATTTTGTCTTTCCAGCTTTTATTAAGATAACTTCA 419
pPI-1      TTTGGAGAGTATTGAAACCTTAATATTTTGTCTTTCCAGCTTTTATTAAGATAACTTCA 420
          *****

pRJ97      TCGAAGGCAATTTATTGGCAACAA----- 443
pPI-1      TCGAAGGCAATTTATTGGCAACAATTACTTGAAGTCTAGCAGATATACTTTACAAAATAA 480
          *****

pRJ97      -----AAAA----- 448
pPI-1      TCTTACAATCTATCAATTTAAAAAATTTTAAAGTTCATTTAATAATAATGATTAAAAA 540
          *****
                                -35 (orf1 nukacina ISK-1)

                                -10 (orf1 simulancina 3299)
pRJ97      -----TGTGATACATTAATGAAGTGAGTTGGTTTTAATTTTTTATCGATAAAGGAATG 502
pPI-1      AATAATTGTGATATATTAATGAAGTAAGTTGGTTTTAATTTTTTATTGATAAAGGAATG 600
          *****

                                -10 (orf1 nukacina ISK-1)

pRJ97      GGAAGCATTGATTTTATGAAGAAAATAAATACTATTATTATAGACGATAATGCAACTACT 562
pPI-1      GGAAA-ATTGATTTTATGAAGAAAATAAATGCTATTATTATAGACGATAATGCAAGTACT 659
          ****

          RBS                                orf1 →

pRJ97      AGAGAGGATTTAAAAGTAAATCTATCTTACTTCTCATTTGTTTCATGTAAAGGTACATTT 622
pPI-1      AGAGAGGATTTAAAAGTAAATCTATCTTACTTCTCATTTGTTTCATGTAAAGGTACATTT 719
          *****

pRJ97      AGTGAATATATTGAAGCCAAAAATACCCTAGATAAG 658
pPI-1      AGTGAATATATTGAAGCCAAAAATACCCTAGATAAG 755
          *****

```

FIGURA 18: Alinhamento das sequências da região intergênica entre os genes *orf1* e *nukA/simA*, presentes nos plasmídeos pRJ97 (*S. simulans* 3299), excetuando-se a sequência de inserção, e pPI-1 (*S. warneri* ISK-1), pelo programa “ClustalW2TM”. Negrito, genes *nukA/simA* e *orf1*; ↓, ponto de inserção da IS257/431; sombra cinza, região da deleção no pRJ97 (causada provavelmente após a inserção da IS257/431); sublinhado, regiões -10 e -35 do promotor do tipo σ^{70} e RBS, sítio de ligação aos ribossomos (SASHIHARA *et al.*, 2000).

Embora apenas um pequeno fragmento do gene *orf1* tenha sido sequenciado, duas substituições de pares de bases do tipo transição e uma do tipo transversão foram encontradas. A tradução da sequência do gene *orf1*, presente na estirpe 3299, pelo programa “Translate”, revelou que a primeira transição encontrada não geraria troca de ácido aminado, caracterizando uma mutação silenciosa. Entretanto, as outras duas substituições gerariam troca de ácidos aminados na sequência da proteína codificada: uma alanina (ácido aminado apolar) seria substituída por uma treonina (ácido aminado polar não carregado) - caracterizando uma mutação “missense” não-conservativa, e uma serina (ácido aminado polar não carregado) também seria substituída por uma treonina - caracterizando uma mutação “missense” conservativa.

6. Análise da transcrição do gene estrutural da simulancina 3299

A análise da transcrição do gene estrutural da simulancina 3299, *simA*, foi realizada através de RT-PCR. A detecção do gene *simA* foi feita empregando-se os oligonucleotídeos nukAF e nukAR (TABELA 5). Os oligonucleotídeos iniciadores girFH (5'GCGTGAATCATTTTTAGATTATGCG^{3'}) e girRH (5'CGGTTACCACGTAGTCCATAG^{3'}), desenhados a partir da sequência-consenso do gene *gyrA*, foram empregados para a detecção do produto deste gene. A temperatura de anelamento desta reação foi 53°C.

Os amplicons correspondentes ao produto dos genes *simA* (195 pb) e *gyrA* (542 pb) foram detectados (FIGURA 19), mostrando que o gene *simA* é transcrito.

7. Cinética de atividade da simulancina 3299

A determinação da cinética de atividade da simulancina 3299 foi realizada em um aparelho “Bioscreen C”, durante 8 h. Pôde-se observar uma redução da DO₆₀₀ da suspensão da estirpe indicadora, de 1,2 para aproximadamente 0,8, em 4 h (FIGURA 20), sugerindo que *M. luteus* ATCC 4698 sofreu lise, embora não fosse total (uma vez que a redução da DO foi de apenas 50%).

8. Determinação das propriedades da simulancina 3299

8.1. Ação da temperatura sobre a atividade da simulancina 3299

Após tratamento a 100°C, por 15 min, a simulancina 3299 apresentou a mesma atividade que o controle que não foi tratado, 1.600 UB/ml. Após 15 min de autoclavação, a atividade da simulancina 3299 foi de 800 UB/ml. Estes resultados revelaram que a simulancina 3299 é resistente à fervura (por 15 min), mas, após autoclavação, a sua atividade foi reduzida em 50%.

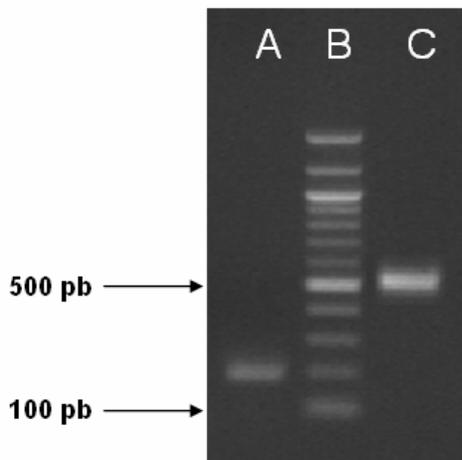


FIGURA 19: Detecção da transcrição do gene *simA*. Gel de agarose a 1,4% (p/v) a uma corrida eletroforética por 1 h a 90 V, mostrando o produto de amplificação, por RT-PCR, do gene *simA*, empregando-se o cDNA da estirpe 3299 como molde. A, amplificação do gene *simA* (195 pb); B, padrão “100-pb DNA ladder”; C, amplificação do gene *gyrA* (542 pb, controle interno). Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

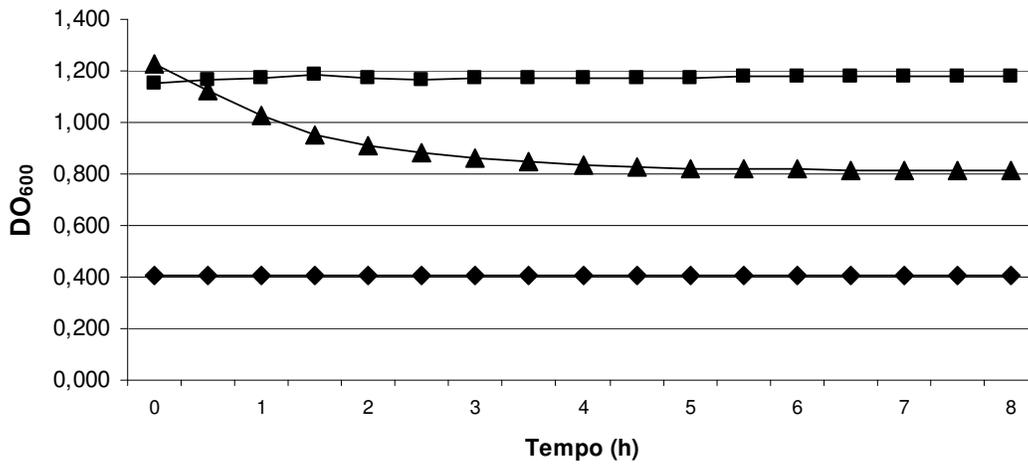


FIGURA 20: Cinética de atividade da similancina 3299. O experimento foi realizada em um aparelho “Bioscreen C”, através da leitura da DO₆₀₀ de uma suspensão de *M. luteus* ATCC 4698 a cada 30 min. ◆ meio GM17 (branco), ■, *M. luteus* ATCC 4698 (controle), e ▲, *M. luteus* ATCC 4698 + similancina 3299 (1.024 UB). Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.

8.2. Ação do pH sobre a atividade da simulancina 3299

A simulancina 3299 apresentou atividade antimicrobiana em diferentes valores de pH: 400 UB/ml, em pH 3,0 e pH 6,0 (controle), e 200 UB/ml, em pH 9,0 e pH 11,0, mostrando que a simulancina mantém a sua atividade antimicrobiana em pH ácido, mas em pH básico a sua atividade é reduzida pela metade.

8.3. Determinação da sensibilidade da simulancina 3299 a enzimas proteolíticas

A simulancina 3299 mostrou-se resistente apenas à proteinase K, mantendo a sua atividade antimicrobiana (800 UB/ml). Após o tratamento com as enzimas protease XXIII e tripsina, a sua atividade foi de 200 UB/ml (25%), sugerindo que a simulancina 3299 é sensível à ação destas enzimas proteolíticas.

9. Análise da influência de sais na produção da simulancina 3299

A produção de nukacina ISK-1 foi estimulada pela presença de sais, após 24 h de crescimento, em testes realizados em fermentadores (SASHIHARA *et al.*, 2001). A fim de se analisar se os fatores que induzem o aumento da expressão da nukacina ISK-1 também induzem a produção da simulancina 3299, foi testado o efeito da concentração de NaCl (0,7 e 2,1 M), KCl (0,7 e 2,1 M) e CaCl₂ (0,2 M) sobre a produção desta bacteriocina, através da determinação da cinética de crescimento da estirpe de *S. simulans* 3299, por 24 h, em meio GM17 e em meio GM17 contendo diferentes concentrações de sais, contagem das células viáveis e análise da produção da simulancina 3299, feitas após 24 h de crescimento.

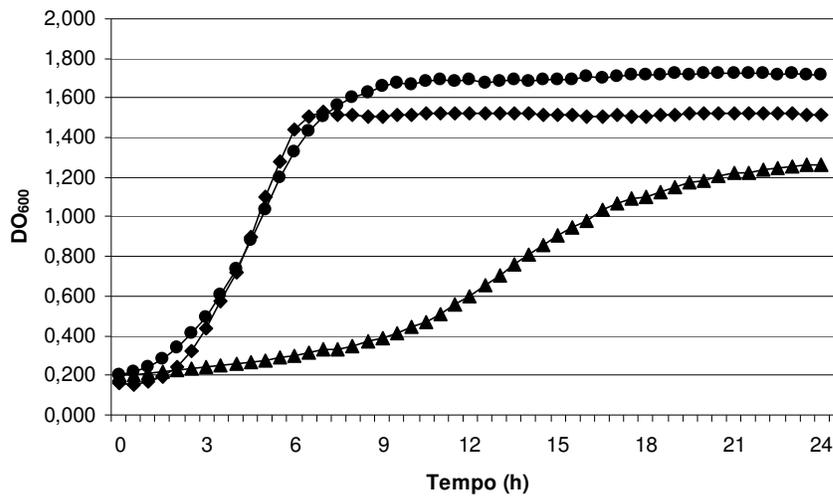
Os resultados apresentados representam a média de cinco experimentos independentes.

A determinação da cinética de crescimento da estirpe *S. simulans* 3299 foi realizada em um aparelho "Bioscreen C", durante 24 h. Pôde-se observar um aumento da DO₆₀₀ de 0,2 para valores entre 1,2 e 1,8, dependendo da condição de cultivo (FIGURA 21).

A cinética de crescimento da estirpe 3299 nos meios GM17, GM17 acrescido de NaCl 0,7 M e GM17 acrescido de KCl 0,7 M foi similar, sugerindo que nesta concentração (0,7 M) a adição de NaCl ou de KCl não afetou o crescimento da estirpe 3299.

A adição de NaCl ou KCl (2,1 M), ao meio de cultura, teve o mesmo efeito sobre a cinética de crescimento da estirpe *S. simulans* 3299. Na presença de 2,1 M de NaCl ou de KCl, pôde-se observar uma diferença marcante na cinética de crescimento da estirpe 3299, pelo aumento de duração da fase log e pela diminuição da taxa de crescimento bacteriano, quando comparadas com a cinética de crescimento desta estirpe em meio GM17.

I.



II.

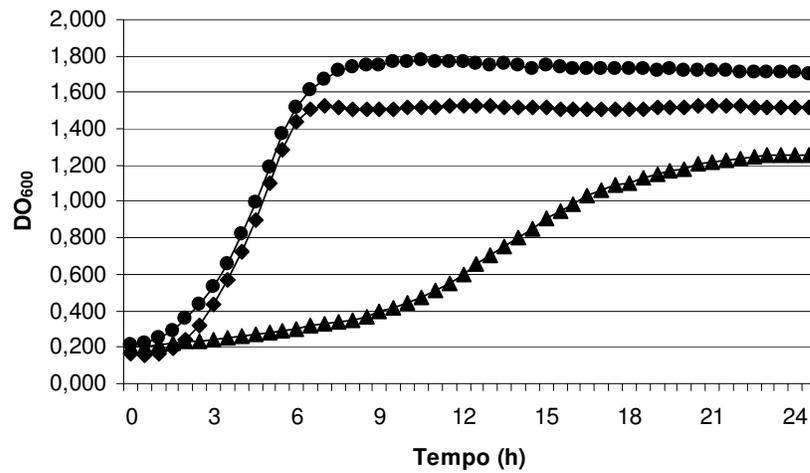


FIGURA 21: Cinética de crescimento da estirpe *S. simulans* 3299 sob condições diversas. O experimento foi realizado em um aparelho “Bioscreen C”, através da leitura da DO₆₀₀ da cultura de *S. simulans* 3299 a cada 30 min. I. Efeito do NaCl sobre o crescimento da estirpe 3299. II. Efeito do KCl sobre o crescimento da estirpe 3299. ◆ crescimento em meio GM17; ● crescimento em meio GM17 acrescido de 0,7 M de sal e ▲, crescimento em meio GM17 acrescido de 2,1 M de sal.

Quando a bactéria foi cultivada nestas condições de estresse, a fase estacionária do crescimento da estirpe 3299 teve início após 21 h de incubação e a cultura alcançou uma DO_{600} máxima de 1,2, inferior àquelas alcançadas pela estirpe nas demais condições testadas (DO_{600} de aproximadamente 1,5 a 1,7).

A média do número de UFC/ml da estirpe *S. simulans* 3299, bem como a média da atividade da simulancina 3299 presente no sobrenadante da cultura, obtidas após 24 h de crescimento, estão apresentadas na TABELA 7.

A fim de se verificar se as variações encontradas nas diferentes condições de cultivo foram significativas, análises estatísticas com o programa R 2.9.0 foram realizadas, considerando-se $p < 0,05$.

A comparação de todas as condições de cultivo, através do teste Kruskal-Wallis (que compara a mediana dos grupos), foi significativa, tanto para o número de UFC/ml da estirpe 3299 ($p= 0,018$), como para a atividade da bacteriocina ($p < 0,0001$). Uma vez que os testes Kruskal-Wallis foram significativos, puderam ser realizadas comparações par a par, através dos testes Mann-Whitney.

9.1. Efeito do NaCl sobre a produção da simulancina 3299

A partir do crescimento da estirpe *S. simulans* 3299, em meio GM17, pôde-se observar a presença de $3,2 \times 10^9$ UFC/ml na cultura e de 213 UB/ml no sobrenadante.

Quando a estirpe *S. simulans* 3299 foi cultivada em meio GM17 acrescido de NaCl 0,7 M, pôde-se observar duas vezes mais bacteriocina no sobrenadante (427 UB/ml), uma diferença considerada significativa ($p=0,021$). Porém, não foram encontradas diferenças significativas no número de UFC/ml detectadas nestas duas condições ($p=0,822$), sugerindo que a adição deste sal (0,7 M) não afetou o crescimento da estirpe *S. simulans* 3299. Com base nestes resultados, pôde-se concluir que a estirpe *S. simulans* 3299 produziu maior quantidade de bacteriocina quando 0,7 M de NaCl foram adicionados ao meio de cultura.

Entretanto, apenas 67 UB/ml foram detectadas quando a estirpe foi cultivada em meio GM17 acrescido de NaCl 2,1 M, apresentando uma diferença significativa ($p=0,007$). Também foram encontradas diferenças significativas entre os números de UFC/ml ($p=0,049$). Estes resultados sugerem que após 24 h de crescimento em meio GM17 acrescido de NaCl 2,1 M, a cultura da estirpe 3299 apresentou um número significativamente menor de células. Provavelmente, a menor quantidade de simulancina 3299 observada está relacionada com a presença de um menor número de células na cultura. Quando a quantidade de UB foi normalizada para 10^7 células, pôde-se observar que, no meio GM17 adicionado de NaCl 2,1 M, a quantidade de bacteriocina produzida parece ser cerca de 28 vezes maior do que a quantidade produzida na presença de GM17 (TABELA 7).

TABELA 7: Efeito do NaCl, KCl e CaCl₂ sobre a produção da simulancina 3299

| Condição de Cultivo (37°C, por 24 h) | UFC/ml | Atividade da Simulancina 3299 (UB/ml) | UB/10⁷ células |
|---|-----------------------|--|----------------------------------|
| GM17 | 3,2 x 10 ⁹ | 213 | 0,7 |
| GM17 + NaCl 0,7 M | 1,6 x 10 ⁹ | 427 | 2,7 |
| GM17 + NaCl 2,1 M | 3,4 x 10 ⁷ | 67 | 19,7 |
| GM17 + KCl 0,7 M | 4,1 x 10 ⁹ | 427 | 1,1 |
| GM17 + KCl 2,1 M | 1,8 x 10 ⁷ | 20 | 11,1 |
| GM17 + CaCl₂ 0,2 M | 4,3 x 10 ⁹ | 267 | 0,6 |

Adicionalmente, foram realizadas comparações entre os meios contendo diferentes concentrações de NaCl: 0,7 M e 2,1 M. Pôde-se observar uma diferença significativa ($p=0,001$) entre a quantidade de bacteriocina presente no sobrenadante de GM17 acrescido de NaCl 0,7 M (427 UB/ml), quando comparada com GM17 acrescido de NaCl 2,1 M (67 UB/ml). Também pôde-se observar uma diferença significativa de UFC ($p=0,049$), sugerindo que a menor quantidade de simulancina 3299 observada está mais uma vez relacionada com a presença de um menor número de células na cultura. Contudo, se for feita uma comparação entre as UB em relação a 10^7 células encontradas em cada meio, observar-se-a que, no meio GM17 adicionado de NaCl 2,1 M, a quantidade de bacteriocina produzida parece ser cerca de sete vezes maior do que a quantidade produzida na presença de NaCl 0,7 M (TABELA 7).

9.2. Efeito do KCl sobre a produção da simulancina 3299

O KCl apresentou efeitos similares aos observados com o NaCl sobre a produção da simulancina 3299.

Assim como a adição de NaCl 0,7M, a adição de KCl 0,7 M ao meio GM17 ocasionou um aumento de simulancina 3299 no sobrenadante da cultura (427 UB/ml), uma diferença considerada significativa ($p=0,049$). A adição de 0,7 M deste sal não afetou o crescimento da estirpe *S. simulans* 3299, quando comparado ao crescimento em GM17 ($p=0,506$). Com base nestes resultados, pôde-se concluir que a estirpe *S. simulans* 3299 também produziu maior quantidade de bacteriocina quando KCl 0,7 M foi adicionado ao meio de cultura.

Quando a estirpe 3299 foi cultivada em meio GM17 acrescido de KCl 2,1M, apenas 20 UB/ml foram detectadas, uma diferença considerada significativa ($p=0,002$). Também foram encontradas diferenças significativas entre os números de UFC/ml ($p=0,049$). Estes resultados sugerem que, após 24 h de crescimento em meio GM17 acrescido de KCl 2,1 M, a cultura da estirpe 3299 apresentou um número significativamente menor de células, assim como em meio GM17 acrescido de NaCl 2,1 M. Do mesmo modo, a menor quantidade de simulancina 3299 observada parece estar relacionada com a presença de um menor número de células na cultura. Quando a quantidade de UB foi normalizada para 10^7 células, pôde-se observar que, no meio GM17 adicionado de KCl 2,1 M, a quantidade de bacteriocina produzida parece ser cerca de 16 vezes maior do que a quantidade produzida na presença de GM17 (TABELA 7).

Por fim, foram realizadas comparações entre os meios contendo diferentes concentrações de KCl. Pôde-se observar uma diferença significativa ($p=0,001$) entre a quantidade de bacteriocina no sobrenadante de GM17 acrescido de KCl 0,7 M (427 UB/ml), quando comparado com GM17 acrescido de KCl 2,1 M (20 UB/ml). Entretanto, entre estas duas condições, houve uma diferença significativa de UFC/ml ($p=0,046$), sugerindo mais uma vez que a menor quantidade de simulancina 3299 observada está relacionada com a

presença de um menor número de células na cultura. Contudo, se for feita uma comparação entre as UB em relação a 10^7 células encontradas em cada meio, observar-se-á que, no meio GM17 adicionado de KCl 2,1 M, a quantidade de bacteriocina produzida parece ser cerca de dez vezes maior do que a quantidade produzida na presença de KCl 0,7 M.

Os resultados obtidos quando KCl foi adicionado ao meio de cultura foram similares àqueles encontrados com meio contendo NaCl. Entretanto, pôde-se observar que, na presença de NaCl, a produção da simulancina 3299 foi maior do que no meio acrescido de KCl.

9.3. Efeito do CaCl_2 sobre a produção da simulancina 3299

Quando a estirpe 3299 foi cultivada em GM17 adicionado de CaCl_2 0,2 M, a produção de simulancina 3299 foi de 267 UB/ml. A comparação entre a produção de bacteriocina neste meio e em meio GM17, sem a adição de sais, revelou que esta diferença não foi significativa ($p=0,456$). Entre os meios GM17 e GM17 adicionado de CaCl_2 0,2 M, também não foram encontradas diferenças significativas no número de UFC/ml ($p=0,512$). Estes resultados sugerem que a estirpe *S. simulans* 3299 produz a mesma quantidade de bacteriocina nestas duas condições.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a simulancina 3299, um lantibiótico com ação antagonística contra *S. agalactiae* envolvidos em mastite bovina, foi purificada e caracterizada.

A cinética da produção da simulancina 3299 foi determinada nos meios BHI e GM17, durante 24 h, a 37°C, visando-se otimizar a sua purificação. A estirpe 3299 apresentou diferentes perfis de crescimento nos meios BHI e GM17. Entre 6 e 8 h, a estirpe 3299 apresentou maior crescimento em meio GM17 do que em meio BHI, porém, após 10 h, o crescimento da estirpe 3299 mostrou-se similar nos dois meios de cultura. Estes resultados sugerem que a fase log do crescimento da estirpe *S. simulans* 3299 foi mais curta em meio GM17 do que em meio BHI. Apesar da diferença observada na cinética de crescimento, a estirpe 3299 alcançou uma DO₆₀₀ final similar nos dois meios testados.

A produção da simulancina 3299 começou a ser detectada após 6 h de crescimento da estirpe 3299 e apresentou um aumento proporcional nos dois meios de cultura. No final da fase log do crescimento da estirpe 3299, pôde-se detectar a produção máxima desta bacteriocina, que foi duas vezes maior em meio GM17 do que em meio BHI.

O máximo da produção das aureocinas A53, A70, MB92, 146L e 215FN também foi detectado entre o final da fase log e o início da fase estacionária do crescimento das estirpes produtoras (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

A simulancina 3299 foi purificada a partir do sobrenadante da cultura da estirpe 3299, através da cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca catiônica e duas corridas de HPLC. Esta estratégia de purificação foi eficiente devido às propriedades deste peptídeo, que se mostrou hidrofóbico e catiônico, assim como a maioria das bacteriocinas (BASTOS *et al.*, 2009).

A massa molecular da simulancina 3299 foi estimada em 2.957,3 Da e apenas uma pequena sequência de sete ácidos aminados, presente no seu terminal amino, foi determinada: KKKSGVI. O sequenciamento do peptídeo foi bloqueado a partir do oitavo ácido aminado, sugerindo que o peptídeo pudesse ser um lantibiótico. A sequência dos sete primeiros ácidos aminados encontrados no peptídeo analisado também estão presentes na nukacina ISK-1 e esta bacteriocina também teve o sequenciamento dos seus ácidos aminados bloqueado neste mesmo ponto, devido à presença de um anel tioéter na sua estrutura (SASHIHARA *et al.*, 2000).

Com base na sequência da nukacina ISK-1, foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores, a fim de se investigar a presença do gene estrutural, *nukA*, na estirpe *S. simulans* 3299. A análise da sequência do amplicon obtido revelou que a simulancina 3299 é codificada por um gene idêntico ao gene *nukA*, que passou a ser denominado *simA*.

A nukacina ISK-1 é um lantibiótico produzido pela estirpe *S. warneri* ISK-1, isolada de um “nukadoko”. O pré-peptídeo é composto por 57 ácidos aminados, incluindo uma

sequência-líder de 30 resíduos. Os 27 ácidos aminados que compõem o peptídeo maduro possuem 2.960 Da, dois resíduos de Lan, um de MeLan e um de Dhb - FIGURA 6 (SASHIHARA *et al.*, 2000; ASO *et al.*, 2004b), pertencendo à família da lacticina 481.

Uma vez que nenhuma diferença entre as sequências dos genes *nukA* e *simA* foi encontrada, provavelmente, a pequena diferença de massa observada (de aproximadamente 2,7 Da) entre a simulancina 3299 e a nukacina ISK-1 se deve a diferenças nos métodos de espectrometria de massa empregados nos dois trabalhos.

Os determinantes genéticos dos lantibióticos podem estar codificados no cromossomo da célula bacteriana, como é o caso da epilancina K7 (VAN DE KAMP *et al.*, 1995b), mas, geralmente, eles são encontrados em plasmídeos (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001).

Na estirpe *S. warneri* ISK-1, os genes envolvidos na biossíntese da nukacina ISK-1 estão codificados no plasmídeo pPI-1 (30,2 kb). O gene *nukA* codifica o pré-peptídeo deste lantibiótico; *nukM* codifica a enzima envolvida nas reações de modificação pós-tradução e *nukT* codifica uma proteína envolvida no processamento e no transporte da bacteriocina (SASHIHARA *et al.*, 2000). A imunidade contra a nukacina ISK-1 é conferida por uma proteína do tipo LanFEG, NukFEG (codificada pelos genes *nukFEG*) e por NukH (codificada pelo gene *nukH*), uma proteína de imunidade capaz de se ligar ao lantibiótico e que atua em cooperação com NukFEG. Após se ligar a NukH, a nukacina ISK-1 é transportada para o espaço extracelular por NukFEG (ASO *et al.*, 2004a; ASO *et al.*, 2005b; OKUDA *et al.*, 2008). Embora o produto do possível gene *orf1* apresente homologia com proteínas do tipo LanR (proteínas reguladoras), a sua função biológica ainda não foi elucidada (SASHIHARA *et al.*, 2000; ASO *et al.*, 2004b).

Os lantibióticos da família da lacticina 481 são peptídeos alongados, que atuam sobre a membrana plasmática das células-alvo e apresentam uma única enzima de modificação, LanM. Devido à similaridade entre a nukacina ISK-1 e os lantibióticos do grupo da lacticina 481, a nukacina ISK-1 também é classificada como um lantibiótico do subtipo All (BIERBAUM & SAHL, 2009). Portanto, a simulancina 3299 também deve ser incluída neste subtipo.

Na estirpe *S. simulans* 3299, os genes envolvidos na biossíntese da bacteriocina estão localizados no plasmídeo pRJ97 (> 25 kb), com uma organização similar àquela encontrada no plasmídeo pPI-1. Embora os genes se encontrem na mesma ordem em ambas as estirpes, o plasmídeo pRJ97 possui um elemento IS257/431 (791 pb), entre os genes *orf1* e *simA*.

As sequências de inserção do tipo IS257/IS431 têm sido frequentemente detectadas em diferentes espécies bacterianas, inclusive em *S. aureus* isolados de mastite bovina. Este elemento também tem sido associado a genes codificadores de resistência a diferentes

antibióticos (KOBAYASHI, ALAM & URASAWA, 2001; COCCHIARO *et al.*, 2006; TUCHSCHERR *et al.*, 2007; MELCHIOR *et al.*, 2009).

A montante do gene *tnp*, que codifica a transposase do elemento IS257/431 identificado, foram encontradas uma sequência RBS e as regiões -10 e -35, do promotor do tipo σ^{70} . Assim como em outras sequências de inserção, a região -35 está localizada no terminal invertido da esquerda do elemento IS (Figura 16). Esta característica está relacionada com o mecanismo de autorregulação do gene da transposase, comumente encontrado entre os elementos de transposição de procariotos (MAHILLON & CHANDLER, 1998).

O alinhamento das sequências da região intergênica *orf1-nukA* e *orf1-simA* revelou uma diferença de 97 pb, sugerindo que a inserção da IS257/431 causou uma deleção no pRJ97, a partir da posição 443, da região entre os genes *orf1* e *simA*, na estirpe 3299.

Geralmente, a inserção dos elementos IS257/431 causa uma duplicação de 8 pb no sítio-alvo (MAHILLON & CHANDLER, 1998). Porém, não foi possível se identificar esta duplicação na região intergênica *orf1-simA*. Provavelmente, a ausência deste segmento de DNA se deve à deleção detectada no plasmídeo pRJ97 e que deve ter ocorrido após a transposição da IS257/431 para o plasmídeo (MAHILLON & CHANDLER, 1998).

Possivelmente, pelo mesmo motivo (deleção detectada no plasmídeo pRJ97), a região -35 do promotor do gene *orf1*, encontrada na região intergênica *orf1-nukA* (SASHIHARA *et al.*, 2000), não foi detectada entre os genes *orf1* e *simA* (FIGURA 18). Entretanto, uma nova região -35, correspondente ao promotor do gene *orf1* (do grupamento genético da simulancina 3299) foi detectada a jusante do gene *tnp*, na repetição invertida da direita do transpóson (FIGURA 16). A região -35 deste promotor (TATATT) tem mais homologia com a sequência canônica descrita para esta região do que aquela apontada por SASHIHARA *et al.* (2000) para o gene *orf1*. A região -10 não sofreu nenhuma alteração (FIGURA 16) e o espaçamento entre as regiões -10 e -35 apresenta 17 pb nos dois grupamentos genéticos, estando, portanto, dentro da faixa de espaçamento considerado ideal (CAMPBELL, WESTBLADE & DARST, 2008).

Embora apenas um pequeno fragmento do gene *orf1* da estirpe 3299 tenha sido sequenciado, duas substituições de pares de bases do tipo transição e uma do tipo transversão foram encontradas: a primeira transição não geraria troca de ácido aminado, caracterizando uma mutação silenciosa. Entretanto, as outras duas substituições gerariam mutação “missense” não-conservativa e mutação “missense” conservativa, sugerindo que outras mutações podem estar presentes nos genes envolvidos na biossíntese da simulancina 3299. Entretanto, pôde-se inferir que essas mutações não afetaram a produção da bacteriocina, uma vez que ela é encontrada no sobrenadante da cultura da estirpe 3299.

A determinação da cinética de atividade da simulancina 3299, empregando-se a bacteriocina 10 vezes concentrada com sulfato de amônio, foi realizada contra a estirpe *M.*

luteus ATCC 4698. Pôde-se observar que esta estirpe sofreu apenas lise parcial pela ação deste lantibiótico.

Apesar do modo de ação da nisina já ter sido amplamente estudado, o modo de ação dos demais lantibióticos ainda não foi completamente elucidado. Os lantibióticos do tipo lacticina 481, incluindo a nukacina ISK-1, parecem interagir com a membrana celular, mas ainda não foi demonstrado que estes lantibióticos sejam capazes de formar poros nesta estrutura (ASADUZZAMAN *et al.*, 2006; DUFOUR *et al.*, 2007; BIERBAUM & SAHL, 2009).

A lise parcial da estirpe *M. luteus* ATCC 4698, causada pela ação da simulancina 3299, também sugere que a atividade deste lantibiótico não está relacionada à formação de poros na membrana, o que provavelmente ocasionaria a lise total da estirpe indicadora (BIERBAUM & SAHL, 2009). A sua ação parece ser, contudo, bactericida, uma vez que a DO da suspensão contendo a estirpe indicadora sofreu uma redução de 50%.

O “nukadoko” é rico em sais e, para sobreviver neste ambiente, a estirpe *S. warneri* ISK-1 está adaptada para crescer sob condições de estresse osmótico. Experimentos realizados em fermentadores mostraram que a produção da nukacina ISK-1 é estimulada pela presença de NaCl, KCl e sorbitol, após 24 h de crescimento (SASHIHARA *et al.*, 2001). Nestas condições de cultivo, os níveis de transcrição do gene *nukA* e do operon *nukM-H* foram aumentados de duas a quatro vezes (SASHIHARA *et al.*, 2001; ASO *et al.*, 2004b).

O efeito da concentração de NaCl (0,7 e 2,1 M) e de KCl (0,7 e 2,1 M) sobre a produção da simulancina 3299 também foi analisado e se mostrou similar àquele observado sobre a produção da nukacina ISK-1. Quando a quantidade de UB foi normalizada para 10^7 células, pôde-se observar que, no meio GM17 adicionado de 2,1 M de NaCl ou de 2,1 M de KCl, houve um aumento significativo da produção de bacteriocina, sugerindo que, assim como a produção da nukacina ISK-1, a produção de simulancina 3299 também é estimulada por estes sais.

Até o momento, nenhum sistema específico envolvido na regulação da expressão da nukacina ISK-1 foi identificado. O produto da *orf1* apresenta homologia com LanR (proteínas reguladoras de resposta). Orf1 apresenta um domínio N-terminal comumente encontrado nos reguladores de resposta, mas não apresenta um domínio C-terminal característico dessas proteínas (geralmente envolvido com a ativação da transcrição). Entretanto, nenhuma ORF correspondente a LanK foi encontrada no grupamento genético da nukacina ISK-1 (SASHIHARA *et al.*, 2000; ASO *et al.*, 2004b). Estes dados sugerem que a produção destas bacteriocinas parece ser regulada por um sistema diferente daquele comumente descrito para a regulação dos lantibióticos.

O cálcio é um íon divalente envolvido em diferentes processos metabólicos da célula bacteriana. Ele contribui para a manutenção da estrutura da parede celular e inibe a formação de biofilme, mediada pela proteína Bap (ARRIZUBIETA *et al.*, 2004). Este íon é essencial para a nutrição humana. Em média, um litro de leite pode conter 1,0 - 1,3 g de

cálcio, sendo este alimento a nossa principal fonte deste nutriente (GAUCHERON, 2005; RAFFERTY & HEANEY, 2008).

Uma vez que a estirpe *S. simulans* 3299 foi isolada de um ambiente rico em cálcio, a ação deste íon sobre a produção de bacteriocina também foi testada. Foram adicionados 0,2 M de CaCl_2 (correspondente a 8 g/l de Ca^{2+}) ao meio de cultura, ou seja, uma concentração cerca de oito vezes maior do que aquela normalmente encontrada no leite (1,0-1,3 g por litro) (GAUCHERON, 2005; RAFFERTY & HEANEY, 2008). Contudo, a produção da simulancina 3299 não foi aumentada, sugerindo que a biossíntese desta bacteriocina não parece ser afetada pela presença de Ca^{2+} .

A simulancina 3299 apresentou uma relativa estabilidade em um amplo espectro de pH, entre 3,0 e 11,0, mantendo 50% da sua atividade após autoclavação. Além disso, este lantibiótico mostrou-se sensível à ação da tripsina e da protease XXIII, mas resistente à ação da proteinase K.

Assim como os outros lantibióticos do tipo lacticina 481, a nukacina ISK-1 é resistente à ação da temperatura, mantendo mais de 60% da sua atividade antimicrobiana após autoclavação, e também se mantém estável em pH de 3,0 a 8,0 (KIMURA *et al.*, 1997; DUFOUR *et al.*, 2007).

A warnericina RB4, uma variante da nukacina ISK-1, também apresenta atividade antimicrobiana em diferentes valores de pH (entre 2,0 e 6,0) e é altamente resistente à temperatura, mantendo 50% da sua atividade mesmo após autoclavação (MINAMIKAWA *et al.*, 2005).

A atividade da nukacina KQU-131, uma outra variante da nukacina ISK-1, foi completamente inativada pela ação de proteinase K e tripsina. Após tratamento a 100°C, por 15 min, e 121°C, também por 15 min, esta bacteriocina manteve 50% e 25% de atividade, respectivamente. Esta bacteriocina apresenta três resíduos de ácidos aminados diferentes em relação à nukacina ISK-1: um está localizado na sequência-líder e os outros dois estão presentes no peptídeo maduro, incluindo a substituição de uma Lan por uma MeLan. Estes dados sugerem que a substituição dos ácidos aminados Ser e Val por Thr e Met, respectivamente (FIGURA 22), afetou a estrutura da bacteriocina, tornando-a mais sensível à ação da temperatura (WILAIPUN *et al.*, 2008).

Até o momento, os antibióticos são geralmente utilizados na prevenção e no combate a bactérias causadoras de mastite bovina, mas a presença de resíduos dessas substâncias no leite e o surgimento de estirpes resistentes representam riscos para a saúde humana (BARKEMA *et al.*, 2006). Por isso, devido às suas propriedades (como resistência ao calor e à ação de algumas enzimas proteolíticas), os lantibióticos têm se mostrado alternativas atraentes ao uso dos antibióticos, para a prevenção ou o combate de infecções bacterianas, incluindo a mastite bovina (BASTOS *et al.*, 2009; BIERBAUM & SAHL, 2009).

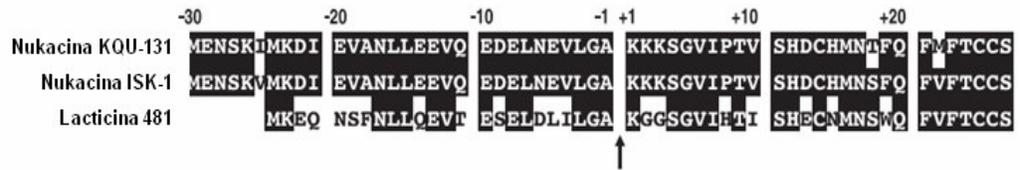


FIGURA 22: Alinhamento das sequências dos pré-peptídeos da nukacina KQU-131, nukacina ISK-1, que é idêntica à simulancina 3299, e lacticina 481 (WILAIPUN *et al.*, 2008). A sombra preta indica os ácidos aminados idênticos e a seta indica a posição de processamento das bacteriocinas.

A nisina já é usada na prevenção da mastite bovina, sendo o agente ativo do “Wipe-Out” (Wipe Out® Dairy Wipes), um produto utilizado para a higienização das tetas antes da ordenha. Seladores de silicone para os tetos, contendo a lacticina 3147 (Cross Vetpharm Group Ltd), também têm se mostrado eficientes na prevenção de mastite causada por estafilococos e estreptococos em testes com animais (COTTER *et al.*, 2005).

A aureocina A53 inibiu 91% das estirpes de *S. aureus* envolvidos em mastite bovina testados por Coelho *et al.* (2007). Já a simulancina 3299 apresentou uma atividade antagonística contra 80% das estirpes de *S. agalactiae*, envolvidos em mastite bovina, testadas (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Combinadas, a aureocina A53 e a simulancina 3299 poderiam ser utilizadas na prevenção ou no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus* e *S. agalactiae*, os principais agentes deste tipo de infecção (CALL, DAVIS & SAWANT, 2008; ZHAO & LACASSE, 2008).

Embora a ação da simulancina 3299 ainda não tenha sido testada contra estirpes isoladas de alimentos, ela apresenta potencial de aplicação neste setor devido às suas propriedades de termoestabilidade e atividade em pH ácido, assim como a wanericina RB4. Esta bacteriocina apresenta atividade antimicrobiana em pH entre 2,0 e 6,0, contra *A. acidoterrestris* (um importante contaminante de sucos de frutas), fazendo da wanericina RB4 uma boa candidata para o controle deste microrganismo na indústria de bebidas, como já foi mencionado anteriormente (MINAMIKAWA *et al.*, 2005). Testes futuros poderão também avaliar o potencial de uso da simulancina 3299 contra agentes deteriorantes de alimentos.

CONCLUSÕES

- ✓ A simulancina 3299 é um lantibiótico de 27 ácidos aminados produzido pela estirpe *S. simulans* 3299, idêntico à nukacina ISK-1.
- ✓ A produção desta bacteriocina é maior quando a estirpe 3299 é cultivada em meio GM17, do que quando a estirpe 3299 é cultivada em meio BHI.
- ✓ Após 8 h, no final da fase log de crescimento da estirpe 3299, pôde-se detectar a produção máxima desta bacteriocina em ambos os meios.
- ✓ Os genes que codificam esta bacteriocina estão presentes no plasmídeo pRJ97, com uma organização similar àquela encontrada no plasmídeo pPI-1 da estirpe *S. warneri* ISK-1, exceto pela presença de um elemento de transposição do tipo IS257 / IS431, entre os genes *orf1* e *simA*.
- ✓ A região intergênica entre *orf1* e *simA* (sem o elemento IS) apresenta 97 pb a menos do que a região intergênica entre *orf1* e *nukA*.
- ✓ Não foi possível se identificar a duplicação do sítio-alvo, geralmente causada pela inserção dos elementos IS257/431, provavelmente como consequência da deleção causada pelo elemento após a sua inserção.
- ✓ Foram encontradas pelo menos duas substituições de pares de bases do tipo transição e uma do tipo transversão na sequência da *orf1*, presente na estirpe 3299.
- ✓ A presença de NaCl ou KCl (0,7 e 2,1 M) no meio de cultura promoveu o aumento da produção da simulancina 3299.
- ✓ A simulancina 3299 manteve a sua atividade antimicrobiana após tratamento a 100°C, por 15 min, e, após autoclavação, a sua atividade foi reduzida em 50%.
- ✓ Este lantibiótico manteve a sua atividade antimicrobiana em pH ácido, mas em pH básico a sua atividade foi reduzida pela metade.
- ✓ A simulancina 3299 mostrou-se sensível à ação da tripsina e da protease XXIII, mas resistente à ação da proteinase K.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de se investigar o potencial de aplicação da simulancina 3299, experimentos complementares poderiam ser realizados:

- ✓ análise da ação combinada da simulancina 3299 com a aureocina A53 contra bactérias Gram-positivas envolvidas em mastite bovina;
- ✓ análise da ação da simulancina 3299 contra estirpes bacterianas isoladas de alimentos ou deteriorantes de alimentos;
- ✓ análise da atividade deste lantibiótico contra outros tipos celulares, tais como células epiteliais humanas e células transformadas e
- ✓ expressão heteróloga desta bacteriocina em um microrganismo com status “GRAS”, a fim de se otimizar a produção desta bacteriocina em larga escala.

**CAPÍTULO II: Produção de bacteriocinas por *S. aureus* envolvidos
em mastite bovina na região Sudeste do Brasil**

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Dentre 257 estirpes de *Staphylococcus* spp., isoladas de diferentes casos de mastite bovina em 56 rebanhos da região Sudeste do Brasil, testadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas (SAM), 46 estirpes (17,9%) se mostraram SAM⁺. Essas 46 estirpes foram identificadas como *S. aureus* e as SAM por elas produzidas foram caracterizadas como bacteriocinas pela sensibilidade demonstrada à ação de enzimas proteolíticas. A análise de imunidade cruzada contra a estirpe *S. aureus* A70, produtora da aureocina A70, a amplificação do operon *aurABCD* (que codifica a referida aureocina) ou a detecção deste mesmo operon por experimentos de hibridação DNA/DNA revelaram que 34 estirpes produzem bacteriocinas semelhantes ou idênticas à aureocina A70 (CEOTTO, 2005).

As 12 estirpes de *S. aureus* que produzem bacteriocinas diferentes da aureocina A70 também se mostraram diferentes das demais bacteriocinas de *S. aureus* descritas na literatura, já caracterizadas: aureocina A53 e estafilococcina C55, sugerindo que se tratam de bacteriocinas inéditas na espécie (CEOTTO, 2005).

Esta etapa do trabalho teve como objetivo confirmar que as bacteriocinas produzidas por essas 12 estirpes de *S. aureus* envolvidas em mastite bovina também eram diferentes das demais bacteriocinas, já caracterizadas, produzidas por estirpes de SCN (Pep5, epicidina 280, epilancina K7, epidermina e simulancina 3299).

Portanto, o objetivo principal desta parte do trabalho foi continuar a identificação das estafilococcinas produzidas por essas 12 estirpes de *S. aureus* e caracterizar aquelas que apresentassem um potencial de aplicação biotecnológica. Assim como outras bacteriocinas, os peptídeos antimicrobianos produzidos por *S. aureus* também podem vir a ser utilizados, na sua forma purificada, na prevenção e no combate às infecções bacterianas, ou ainda como biopreservativos de alimentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS

1. Identificar novas bacteriocinas produzidas por *S. aureus*.

Abordagens experimentais: detecção dos genes *pepA* (gene estrutural da Pep5), *ecilA* (gene estrutural da epicidina 280), *elkA* (gene estrutural da epilancina K7), *epiA* (gene estrutural da epidermina) e *simA* (gene estrutural da simulancina 3299), através de PCR e/ou hibridação DNA/DNA.

2. Caracterizar preliminarmente as bacteriocinas

Abordagens experimentais: análise da ação da temperatura sobre a atividade das novas bacteriocinas produzidas por *S. aureus* e determinação do seu espectro de ação.

3. Determinar as melhores condições de produção da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

Abordagem experimental: cinética de produção da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185.

4. Purificar a(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

Abordagens experimentais: obtenção da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 a partir do sobrenadante da cultura da estirpe *S. aureus* 4185, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e HPLC.

5. Caracterizar molecularmente a(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185.

Abordagens experimentais: determinação da massa molecular, através de espectrometria de massa MALDI-TOF, e da sequência dos ácidos aminados da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185, através de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF, e identificação de regiões de similaridade entre as sequências de ácidos aminados obtidas e as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Estirpes e condições de crescimento

No CAPÍTULO II, foram estudadas as bacteriocinas produzidas por 12 estirpes de *S. aureus* isoladas de gado com mastite, provenientes de oito rebanhos bovinos da região Sudeste do Brasil (TABELA 8). Estas estirpes foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Aparecida Vasconcelos de Paiva Brito, da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Outras estirpes bacterianas foram utilizadas como indicadoras para a determinação do espectro de ação das bacteriocinas (TABELA 9). As estirpes pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* foram cultivadas em meio MRS [Man, Rogosa & Sharpe (Oxoid)], a 30°C por 18 h. As demais estirpes empregadas neste trabalho foram crescidas em meio TSB, BHI ou GM17, a 37°C por 18 h. As bactérias foram estocadas em meio TSB ou MRS acrescido de 40% (v/v) de glicerol, a -20°C.

Os meios de cultura foram utilizados nas formas líquida ou sólida.

2. Ação da temperatura sobre a atividade das bacteriocinas produzidas por *S. aureus*

Doze estirpes de *S. aureus* Bac⁺ (3853, 3913, 3959, 4045, 4046, 4093, 4100, 4150, 4180, 4183, 4185 e 4230) foram cultivadas em 3 ml de meio GM17 por 18 h, a 37°C. Após centrifugação a 12.100 x *g* por 5 min, as células foram descartadas. O sobrenadante da cultura foi esterilizado por filtração com membranas (Millipore, com poros de 0,45 µm) e mantido no gelo até o momento do uso. Uma alíquota de 1 ml foi tratada a 80°C, por 15 min. Imediatamente após o tratamento, o sobrenadante tratado foi para o gelo.

A atividade das bacteriocinas após o tratamento foi testada pelo método de microdiluição em placa de poliestireno (item 2.2, CAPÍTULO I).

3. Determinação do espectro de ação das bacteriocinas

O espectro de ação das estafilococcinas foi determinado através do teste de atividade das bacteriocinas em placa de poliestireno (item 2.2, CAPÍTULO I), empregando-se como indicadoras as estirpes: *Bacillus cereus* 2710, *Enterococcus faecalis* 2708, *Lactobacillus sake* 2313, *Lactococcus lactis* IL1403, *Listeria innocua* 397, *Listeria monocytogenes* 11LM, *L. monocytogenes* L1/2A, *L. monocytogenes* 7898, *Leuconostoc mesenteroides* NCDO 529, *S. aureus* 4, *S. epidermidis* 118, *S. epidermidis* 102Hp e *S. haemolyticus* 69Hp.

TABELA 8: Estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina (GEOTTO *et al.*, 2009).

| <i>S. aureus</i> Bac⁺ (Rebanho) | Perfil Plasmidial (kb) | Perfil de Resistência a Drogas |
|---|-------------------------------|---------------------------------------|
| 3853 [§] (1) | 2,9 - 3,2 - 4,5 | Ap, Cp, Em, Gm, Pc, Tc |
| 3913 [§] (2) | 3,1 - 3,6 - 4,9 | Ap, Cp, Em, Pc, Tc |
| 3959 [§] (3) | 3,1 - 3,6 - 5,0 | Ap, Cl, Gm, Pc, Tc |
| 4093 [§] (4) | 2,4 - 3,8 - 13,5 - > 25 | Ap, Em, Pc, Tc |
| 4100 (4) | 3,5 | Ap, Pc |
| 4045 [§] (5) | - | Ap, Cl, Em, Gm, Pc, Tc |
| 4046 (5) | 8,0 - > 25 | Em |
| 4150 (6) | 3,0 - 4,2 | Ap, Pc, Tc |
| 4180 (7) | 3,4 | - |
| 4183 (7) | 7,9 | Ap, Gm, Pc |
| 4185 (7) | 11,5 | Ap, Pc |
| 4230 (8) | 3,0 - 5,5 | Ap, Ce, Pc |

Ap, ampicilina; Ce, cefalotina; Cl, clindamicina; Co, cloranfenicol; Cp, ciprofloxacina; Em, eritromicina; Gm, gentamicina; Pc, penicilina; Tc, tetraciclina.

[§] Estirpe multirresistente a drogas

TABELA 9: Outras estirpes bacterianas empregadas neste trabalho.

| Estirpes | Características Relevantes | Referência/ Fonte |
|---|---|--|
| <i>Bacillus cereus</i> 2710 | - | 1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 2708 | - | CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Lactobacillus sake</i> 2313 | - | 1 |
| <i>Lactococcus lactis</i> IL1403 | - | CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Listeria innocua</i> 397 | - | CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 11LM | - | CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| L1/2A | - | CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| 7898 | - | CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NCDO 529 | - | 1 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | Sensibilidade a bacteriocinas | ATCC 4698 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> A70 4 | Bac ⁺ (aureocina A70); pRJ6 (7,9 kb) Isolada de infecção nosocomial | GIAMBIAGI-DEMARVAL <i>et al.</i> , 1990 CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 5 BN 280 K7 Tü3298 102 HP 118 | Bac ⁺ (Pep5); pED503 (20 kb) Bac ⁺ (epidina 280); pCHO1 (>40 kb) Bac ⁺ (epilancina K7) Bac ⁺ (epidermina); pTü32 (54 kb) Isolada de infecção nosocomial; Biofilme ⁺ ; <i>mecA</i> ⁺ Isolada de infecção nosocomial | ERSFELD-DRESSEN, SAHL & BRANDIS, 1984 HEIDRICH <i>et al.</i> , 1998 VAN DE KAMP <i>et al.</i> , 1995b ALLGAIER <i>et al.</i> , 1986 POTTER <i>et al.</i> , 2009 CEOTTO <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> 69Hp | Isolada de infecção nosocomial; Biofilme ⁺ ; <i>mecA</i> ⁺ | POTTER <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Staphylococcus simulans</i> 3299 | Bac ⁺ (simulancina 3299); pRJ97 (> 25 kb) | Esta Tese |

¹ Dr. Ingolf Nes, "Laboratory of Microbial Gene Technology", "Department of Chemistry and Biotechnology", "Norwegian University of Life Sciences"

Bac⁺, estirpe produtora de bacteriocina

mecA⁺, estirpe resistente à metilina (o gene *mecA* foi detectado por PCR)

4. Cinética de produção da(s) bacteriocina(s) sintetizada(s) pela estirpe 4185

A fim de se definir as condições ótimas para a produção da(s) bacteriocina(s) pela estirpe 4185, esta bactéria foi cultivada em dois meios distintos: GM17 e BHI, conforme descrito no item 3 (CAPÍTULO I).

5. Purificação da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

A purificação da(s) aureocina(s) 4185 foi realizada através de: obtenção da bacteriocina no sobrenadante da cultura da estirpe 4185, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e HPLC.

5.1 Obtenção da(s) bacteriocina(s) no sobrenadante

O(s) peptídeo(s) antimicrobiano(s) produzido(s) pela estirpe 4185 foi (foram) purificado(s) a partir de 1 litro de cultura da estirpe Bac⁺, conforme descrito no item 4.1 (CAPÍTULO I).

A atividade antimicrobiana de cada uma das frações obtidas foi testada em placa de microdiluição (item 2.2, CAPÍTULO I).

5.2. Precipitação com sulfato de amônio

O sobrenadante obtido foi submetido à precipitação com 40% (p/v) de sulfato de amônio (Merck), visando-se a obtenção da bacteriocina 10 vezes concentrada. O sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante obtido e a precipitação foi realizada a 4°C, durante pelo menos 2 h, sob agitação. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 31.000 x g, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado e, em seguida, dissolvido em 100 ml de água Milli-Q estéril.

5.3. Cromatografia de troca catiônica

O pH do sobrenadante 10 vezes concentrado com sulfato de amônio (item 5.2) foi ajustado para 4,0, pela adição de HCl (6 M) e submetido à cromatografia de troca catiônica, realizada conforme descrito no item 4.3 (CAPÍTULO I).

Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 30 ml de tampão fosfato de sódio pH 5,8, 10 ml de NaCl 0,1 M, 50 ml de NaCl 0,5 M, 50 ml de NaCl 1 M e 10 ml de NaCl 5 M, para a eluição da bacteriocina. O eluato foi recolhido em frações de 10 ml. A resina foi armazenada conforme recomendado pelas instruções do fabricante. As frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram utilizadas para a HPLC.

5.4. HPLC

A purificação por HPLC também foi realizada conforme descrito no CAPÍTULO I (item 4.4). Quando necessário, as frações da segunda HPLC, que apresentaram maior

atividade antimicrobiana, foram submetidas a uma terceira HPLC, novamente na coluna “Sephasil Peptide C₈”.

6. Caracterização molecular da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

A caracterização molecular das bacteriocinas purificadas foi realizada através da determinação da sua massa molecular e do sequenciamento dos seus ácidos aminados, em colaboração com o Dr. Morten Skaugen (“Norwegian University of Life Sciences”).

6.1. Determinação da massa molecular

A massa molecular das bacteriocinas foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF em um aparelho “Ultraflex MALDI TOF/TOF” (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), no modo positivo, a 25 kV, por 40 ns. Todo o espectro foi calibrado externamente, segundo as instruções do fabricante. Os resultados obtidos foram gravados usando a célula “LIFT” do instrumento.

6.2. Sequenciamento dos ácidos aminados

A sequência de ácidos aminados da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 foi determinada com base no protocolo descrito por Peters e colaboradores em 2001 e por Lee e colaboradores em 2004, também através de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.

7. Cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

A cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 foi realizada conforme descrito no item 6 do CAPÍTULO I.

8. Digestão de DNA genômico

O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* (Invitrogen) ou *HindIII* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

As digestões foram realizadas empregando-se 1 µg de DNA genômico (isolado conforme descrito no item 10 do CAPÍTULO I e dosado conforme descrito no item 12 do CAPÍTULO I), 20 unidades de cada uma das enzimas, no seu respectivo tampão, em um volume total de 40 µl, por 12 h, a 37°C.

9. Detecção dos genes *pepA*, *epiA*, *elkA*, *eciA* e *simA* por PCR

A fim de se detectar os genes estruturais das estafilococcinas Pep5, epidermina, epilancina K7, epigidina 280 e simulancina 3299 nas 12 estirpes de *S. aureus* Bac⁺, foram realizadas reações de PCR, conforme descrito no item 11 (CAPÍTULO I). O anelamento foi realizado entre 45-52°C, dependendo das propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores,

desenhados com base na sequência dos genes em questão (TABELA 10). O DNA genômico das estirpes (item 10, CAPÍTULO I) foi utilizado como molde.

As estirpes de *Staphylococcus* spp. Bac⁺ foram empregadas como controle positivo para a amplificação do gene estrutural da bacteriocina correspondente e a estirpe *S. aureus* A70 foi empregada como controle negativo em todas as reações.

Os amplicons, obtidos por PCR, foram observados em gel de agarose 1,4% (p/v), preparado em tampão TAE. Foram utilizados 10 µl do produto da amplificação do PCR e 5 µl de corante para eletroforese. Um padrão de DNA (“100-bp DNA ladder” - Promega) foi utilizado como marcador de tamanho molecular. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V durante uma hora. O gel foi corado em solução de EtBr, os fragmentos amplificados foram visualizados em um aparelho transiluminador de luz UV e registrados por um sistema de imagens.

10. Detecção dos genes *pepA*, *epiA*, *elkA*, *eciA* e *simA* por hibridação DNA/DNA

A fim de se confirmar a ausência dos genes estruturais das estafilococcinas Pep5, epidermina, epilancina K7, epicidina 280 e simulancina 3299 no genoma das 12 estirpes de *S. aureus* Bac⁺, foram realizadas hibridações DNA/DNA, conforme descrito por Ceotto *et al.*, (2009). Os genes estruturais (*pepA*, *epiA*, *elkA*, *eciA* e *simA*) foram amplificados por PCR (item 9), purificados com o sistema “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e empregados como sonda.

A análise da sequência dos amplicons empregados como sonda (*pepA*, *epiA*, *elkA*, *eciA* e *simA*) com o programa “NEBcutter V2.0” revelou que *pepA*, *epiA*, *elkA* e *eciA* não apresentavam nenhum sítio para as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Entretanto, o amplicon *simA* apresentou um sítio para a enzima *EcoRI*. Visando-se a hibridação da sonda com um único fragmento de DNA digerido, o DNA genômico das estirpes testadas foi digerido com *EcoRI* (item 8), para a detecção dos genes *pepA*, *epiA*, *elkA* e *eciA*, e com *HindIII*, para a detecção do gene *simA*.

Os fragmentos de DNA genômico, obtidos a partir da digestão com as enzimas *EcoRI* ou *HindIII*, foram separados por eletroforese em géis de agarose 0,7% (p/v), preparados em tampão TAE, visualizados e registrados. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V durante uma hora. Foram utilizados 30 µl do produto da digestão e 5 µl de corante para eletroforese.

TABELA 10: Oligonucleotídeos iniciadores empregados para a detecção dos genes *pepA*, *eciA*, *elkA*, *epiA* e *nukA*.

| Gene Amplificado | Oligonucleotídeos Iniciadores | Tm | Tamanho do Amplicon Esperado (pb) | Observações Relevantes |
|------------------|--|------|-----------------------------------|---|
| <i>pepA</i> | “Forward”: 5' AGAGGAGGTGGTTATATATG ^{3'} | 48°C | 427 | Gene estrutural da Pep5 (número de acesso: Z49865) |
| | “Reverse”: 5' TGAGTTCCATGCCCAGTG ^{3'} | 50°C | | |
| <i>epiA</i> | “Forward”: 5' GGAGTGTTTAAAATGGAAGC ^{3'} | 50°C | 431 | Gene estrutural da epidermina (número de acesso: X62386) |
| | “Reverse”: 5' CCTTTTCCCAGTCTATTTTG ^{3'} | 49°C | | |
| <i>elkA</i> | “Forward”: K7F 5' CTCAAAGAGTGATTTAAGTCCGC ^{3'} | 49°C | 115 | Gene estrutural da epilancina K7 (número de acesso: X87412) |
| | “Reverse”: K7R2 5' CCACCAGTAATATTGCAACCGC ^{3'} | 50°C | | |
| <i>eciA</i> | “Forward”: 280F 5' CGGAGGGATATATTATGG ^{3'} | 41°C | 195 | Gene estrutural da epcidina 280 (número de acesso: Y14023) |
| | “Reverse”: 280R 5' CAATCACTACTATTGACAATCAC ^{3'} | 45°C | | |
| <i>simA</i> | “Forward”: nukAF 5' AGGAGGTAACAAACATGG ^{3'} | 52°C | 195 | Gene estrutural da simulancina 3299 (número de acesso: GQ380548) |
| | “Reverse”: nukAR 5' CCCCTTTTATGAACAACAAG ^{3'} | 54°C | | |

Em seguida, o gel de agarose foi tratado com uma solução de HCl 0,12 N por 15 min, para a hidrólise dos fragmentos maiores de DNA. Após uma lavagem com água destilada, para a remoção da solução de HCl, o gel foi submetido a um tratamento com uma solução de desnaturação (NaOH 0,2 M; NaCl 1,5 M) por 1 h, à temperatura ambiente, com agitação suave, e novamente lavado com água destilada. Posteriormente, o gel foi tratado com a solução de neutralização (Tris 0,5 M; NaCl 3 M, pH 7,2) por 2 h, à temperatura ambiente, com agitação suave, trocando-se a solução após 1 h. Após a etapa de neutralização, o gel foi lavado com água destilada.

O DNA foi transferido, por capilaridade, em presença de SSC seis vezes concentrada (NaCl 0,9 M, citrato de sódio 90 mM), do gel de agarose para uma membrana de náilon (GE Healthcare). A membrana foi umedecida com SSC seis vezes concentrada, antes do início da transferência, que ocorreu à temperatura ambiente, por 16 a 18 h.

Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC seis vezes concentrada, posteriormente colocada para secar em um forno pré-aquecido a 80°C, por 2 h, entre folhas de papel de filtro grosso, e foi armazenada à temperatura ambiente, até o momento da hibridação. O restante do gel foi corado em solução de EtBr e visualizado em um aparelho transiluminador de luz UV para se verificar se a transferência de DNA havia sido completa.

A marcação das sondas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP e as hibridações de DNA foram realizadas empregando-se o sistema comercial “Redprime II Random Prime Labelling System” (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos antes da hibridação, com o sistema “ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. A hibridação foi detectada por exposição durante 1 h ao filme de raio-X Hyperfilm (GE Healthcare), revelado com Dektol (Kodak).

RESULTADOS

1. Detecção dos genes estruturais de estafilococcinas: *pepA*, *eciA*, *elkA*, *epiA* e *simA*

A presença dos genes estruturais *pepA*, *eciA*, *elkA*, *epiA* e *simA*, envolvidos na biossíntese das estafilococcinas Pep5, epicidina 280, epilancina K7, epidermina e simulancina 3299, respectivamente, foi investigada nas 12 estirpes Bac⁺ isoladas de mastite bovina na região Sudeste do Brasil, a fim de se complementar a caracterização iniciada em trabalho anterior (GEOTTO, 2005).

Nenhum dos genes foi detectado, nem por PCR e nem por hibridação DNA/DNA, sugerindo que as 12 estirpes Bac⁺ produzem estafilococcinas distintas das já descritas na literatura. Alguns exemplos dos resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 23.

2. Sensibilidade à temperatura

As bacteriocinas produzidas pelas 12 estirpes de *S. aureus* foram obtidas a partir do sobrenadante da cultura, após 18 h de cultivo em meio GM17, a 37°C, e suas atividades foram testadas contra a estirpe indicadora *M. luteus* ATCC 4698, em placas de poliestireno.

Os resultados obtidos com todas as estirpes analisadas estão apresentados na FIGURA 24. As estirpes 4100, 4183 e 4230 apresentaram a maior produção de bacteriocina (2.560 UB/ml), enquanto a estirpe 4185, apresentou a menor produção (160 UB/ml), dentre as estirpes testadas.

Todos os sobrenadantes apresentaram redução de pelo menos 94% da atividade antimicrobiana após o tratamento a 80°C, por 15 min (FIGURA 24): 3853 (99%), 3913 (97%), 3959 (97%), 4045 (97%), 4046 (97%), 4093 (97%), 4100 (97%), 4150 (94%), 4180 (97%), 4183 (98%), 4185 (100%) e 4230 (97%). Estes resultados sugerem que estas bacteriocinas são sensíveis à ação da temperatura.

3. Espectro de ação das estafilococcinas

As estafilococcinas produzidas pelas estirpes 3853, 3913, 3959, 4045, 4046, 4093, 4100, 4150, 4180, 4183 e 4230 inibiram somente *M. luteus* ATCC 4698.

A(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe *S. aureus* 4185 foi (foram) capaz(es) de inibir *L. lactis* IL1403, todas as estirpes de *Listeria* spp. testadas, incluindo *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*.

L. monocytogenes e *B. cereus* são importantes patógenos envolvidos na contaminação de alimentos. As estirpes de *S. aureus* e SCN testadas foram isoladas de pacientes com infecções nosocomiais em hospitais da região Sudeste do Brasil.

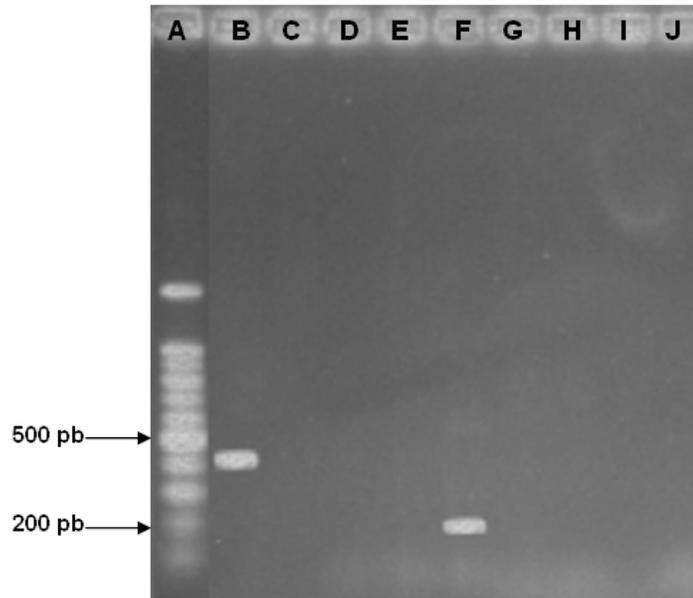


FIGURA 23: Detecção dos genes *epiA* e *eciA*, por PCR. Gel de agarose a 1,4% (p/v) mostrando o produto de amplificação dos genes *epiA* e *eciA*, submetidos a uma corrida eletroforética por 1 h a 90 V. A, padrão “100-pb DNA ladder”; B a E, detecção do gene *epiA*; F a J, detecção do gene *eciA*. As reações foram realizadas empregando-se como molde o DNA das estirpes: B, *S. epidermidis* Tü3298 (controle positivo), C, *S. aureus* 3853; D, *S. aureus* 3913; E, *S. aureus* 3959; F, *S. epidermidis* BN 280 (controle positivo); G, *S. aureus* 4045; H, *S. aureus* 4046; I, *S. aureus* 4180 e J, *S. aureus* 4185. Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

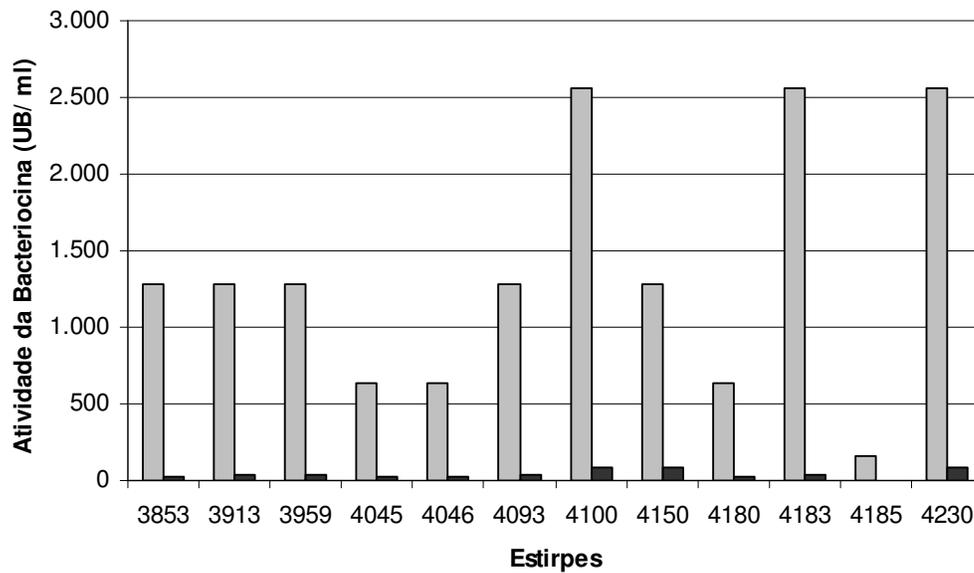


FIGURA 24: Sensibilidade das bacteriocinas produzidas por *S. aureus* à ação da temperatura. Barras cinzas, atividade antimicrobiana do sobrenadante filtrado contra *M. luteus* ATCC 4698; barras pretas, atividade do sobrenadante após tratamento a 80°C, por 15 min, contra *M. luteus* ATCC 4698. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.

Por apresentar potencial de aplicação biotecnológica no controle de bactérias potencialmente patogênicas, a(s) estafilococcina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 foi (foram) escolhida(s) para ser (serem) purificada(s) e caracterizada(s).

4. Cinética de produção da(s) bacteriocina(s) pela estirpe 4185

A cinética de produção da(s) bacteriocina(s) sintetizada(s) pela estirpe 4185 foi determinada nos meios BHI e GM17, por 24 h (FIGURA 25).

A produção de bacteriocina(s) começou a ser detectada após 6 h de crescimento da estirpe 4185: 40 UB/ml foram detectadas, tanto em meio BHI como em meio GM17. Após 8 h de crescimento, verificou-se que não houve aumento da produção de bacteriocina(s) em meio BHI (40 UB/ml). Entretanto, em meio GM17, verificou-se o dobro de atividade, 80 UB/ml. Após 10 h de crescimento, foram detectadas 80 UB/ml em ambos os meios de cultura, sendo este o máximo de produção detectado em meio BHI. Já com 12 e 24 h de crescimento da estirpe 4185, pôde-se detectar a produção máxima dessa(s) bacteriocina(s) em meio GM17 (160 UB/ml).

Uma vez que houve maior produção de bacteriocina(s) em GM17, este meio foi selecionado para as etapas seguintes deste trabalho.

5. Purificação da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

A(s) bacteriocina(s) produzida(s) foi (foram) purificada(s) a partir de 1 litro do sobrenadante da cultura da estirpe 4185, crescida em meio GM17 a 37°C, por 18 h, através de: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e HPLC.

O sobrenadante da cultura da estirpe 4185, concentrado com sulfato de amônio e contendo pelo menos 512.000 UB, foi submetido à cromatografia de troca catiônica. O eluato da cromatografia de troca catiônica foi recolhido em frações de 10 ml e a bacteriocina foi eluída, predominantemente, nas três primeiras frações de NaCl 1 M (em um total de 256.600 UB). Estas três frações (30 ml) foram submetidas à HPLC. A purificação da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 foi realizada após quatro corridas de HPLC.

A primeira corrida foi realizada, empregando-se a coluna "Resource RPC 1-ml", para a purificação inicial das frações que apresentaram atividade antimicrobiana, após a cromatografia de troca catiônica. A bacteriocina foi eluída em um gradiente de água e isopropanol (contendo 0,1% TFA) em 24 frações de 1 ml. Foi detectada atividade antimicrobiana nas frações 13 a 19, com um total de pelo menos 98.720 UB, ou seja, houve pelo menos 38,4% de recuperação. Dentre elas, as frações 14 e 17 apresentaram maior atividade antimicrobiana (> 20.280 UB cada uma).

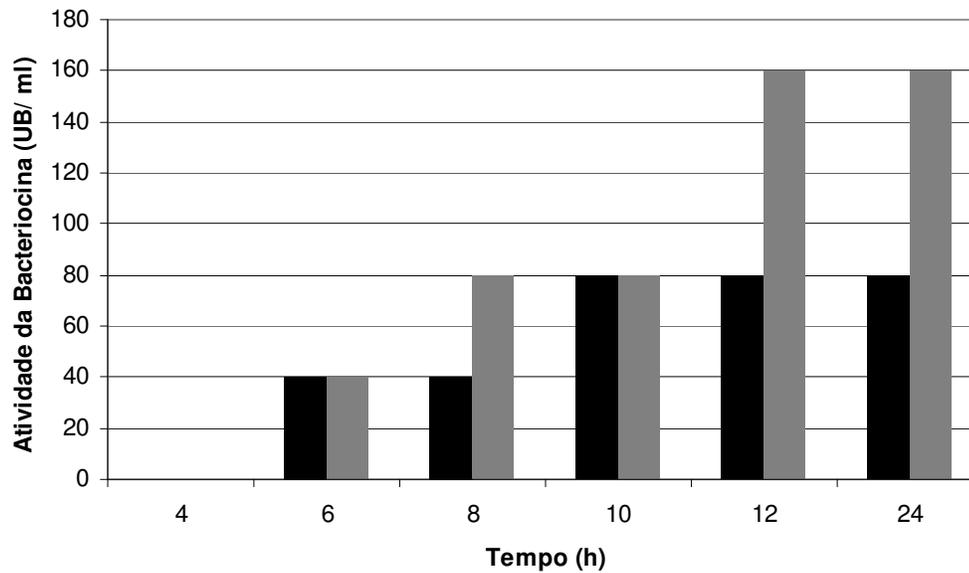


FIGURA 25: Cinética de produção de bacteriocina(s) pela estirpe 4185. Barras pretas, atividade de bacteriocina produzida em meio BHI, contra *M. luteus* ATCC 4698; barras cinzas, atividade de bacteriocina produzida em meio GM17, contra *M. luteus* ATCC 4698. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.

As frações 13 e 14 (> 52.000 UB), obtidas na primeira HPLC, foram submetidas a duas corridas de HPLC, empregando-se a coluna “Sephasil Peptide C₈”. A eluição foi realizada em um gradiente de água e isopropanol (contendo 0,1% TFA), em frações de 500 µl. Após a primeira corrida na coluna “Sephasil Peptide C₈”, foram recuperadas 70.820 UB, nas frações 16, 17 e 18, eluídas com cerca de 40% de isopropanol. Estas frações foram, então, submetidas a uma segunda corrida e 23.360 UB foram recuperadas nas frações 9, 10 e 11, também eluídas com cerca de 40% de isopropanol (FIGURA 26).

Já as frações 15 a 19 (> 60.000 UB), obtidas na primeira HPLC - realizada com a coluna “Resource RPC 1-ml”, também foram submetidas a duas corridas de HPLC, empregando-se a coluna “Sephasil Peptide C₈” e a eluição foi realizada em um gradiente de água e isopropanol (contendo 0,1% TFA), em frações de 500 µl. Após a primeira corrida na coluna “Sephasil Peptide C₈”, foram recuperadas 61.440 UB, nas frações 31, 32 e 33, eluídas com cerca de 80% de isopropanol. Estas frações foram, então, submetidas a uma segunda corrida na mesma coluna. Foram recuperadas 16.680 UB nas frações 13 e 14, também eluídas com cerca de 80% de isopropanol (FIGURA 27).

Estes resultados sugerem que a atividade encontrada no sobrenadante da estirpe 4185 estaria relacionada com a presença de pelo menos dois peptídeos distintos.

As frações finais 9, 10 e 11 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 40% de isopropanol) e as frações finais 13 e 14 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 80% de isopropanol) foram empregadas para a determinação da massa molecular e para o sequenciamento dos ácidos aminados.

6. Caracterização molecular da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

A massa molecular dos peptídeos contidos nas frações finais 9, 10 e 11 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 40% de isopropanol) foi estimada em: 2.305,3 ± 1,5 Da (peptídeo A), 2.327,3 ± 1,5 Da (peptídeo B) e 3.005,5 ± 1,5 Da (peptídeo C) - FIGURA 28 (I). Já a massa molecular dos peptídeos contidos nas frações finais 13 e 14 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 80% de isopropanol) foi estimada em: 6.413,5 ± 1,5 Da (peptídeo D) e 12.834,5 ± 1,5 Da (peptídeo E) - FIGURA 28 (II).

Apenas a sequência de alguns fragmentos dos peptídeos foi determinada: SLLEQFTGK, a partir do sequenciamento dos peptídeos contidos nas frações 9, 10 e 11 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 40% de isopropanol); NNTSHNLPLGWFNVK, NNLAQGTFNATK e ALLYDER, a partir do sequenciamento dos peptídeos contidos nas frações 13 e 14 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 80% de isopropanol).

Os resultados obtidos estão resumidos na TABELA 11.

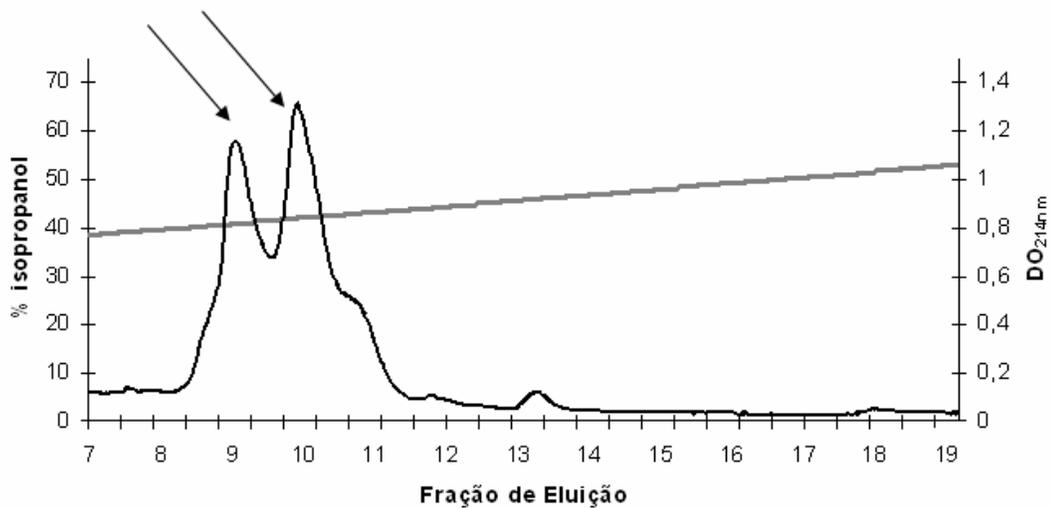


FIGURA 26: Eluição da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 com 40% de isopropanol. A eluição foi realizada em um gradiente de água e isopropanol (0 a 100%), contendo 0,1% de TFA, após HPLC na coluna “Sephasil Peptide C₈”, registrada a 214 nm. As setas indicam as frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana e foram empregadas para a determinação da massa molecular e para o sequenciamento dos ácidos aminados da bacteriocina. Linha cinza, concentração de isopropanol.

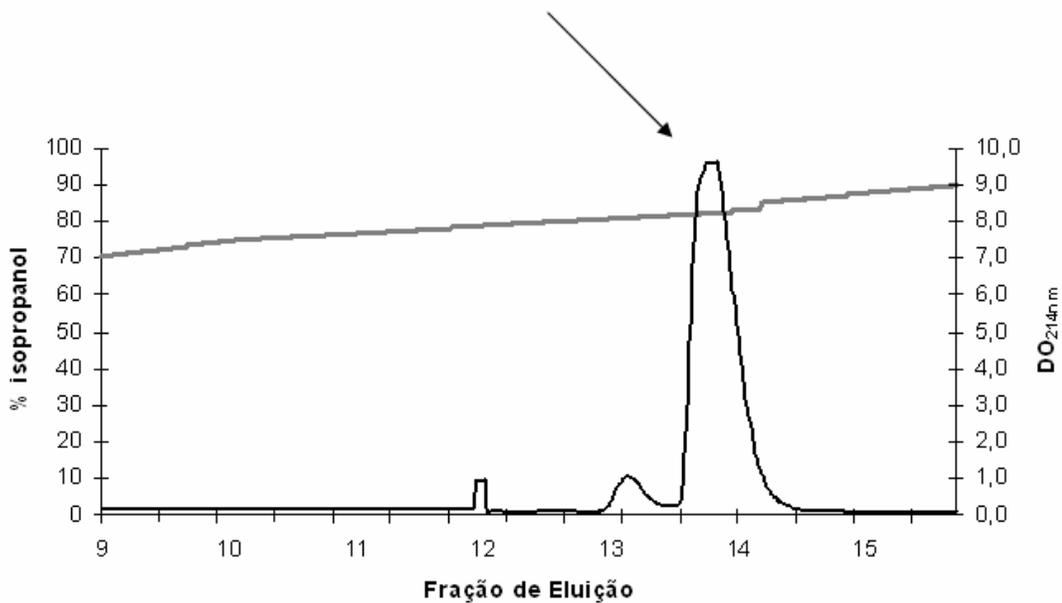


FIGURA 27: Eluição da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 com 80% de isopropanol. A eluição foi realizada em um gradiente de água e isopropanol (0 a 100%), contendo 0,1% de TFA, após HPLC na coluna “Sephasil Peptide C₈”, registrada a 214 nm. A seta indica as frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana e que foram empregadas para a determinação da massa molecular e para o sequenciamento dos ácidos aminados da bacteriocina. Linha cinza, concentração de isopropanol.

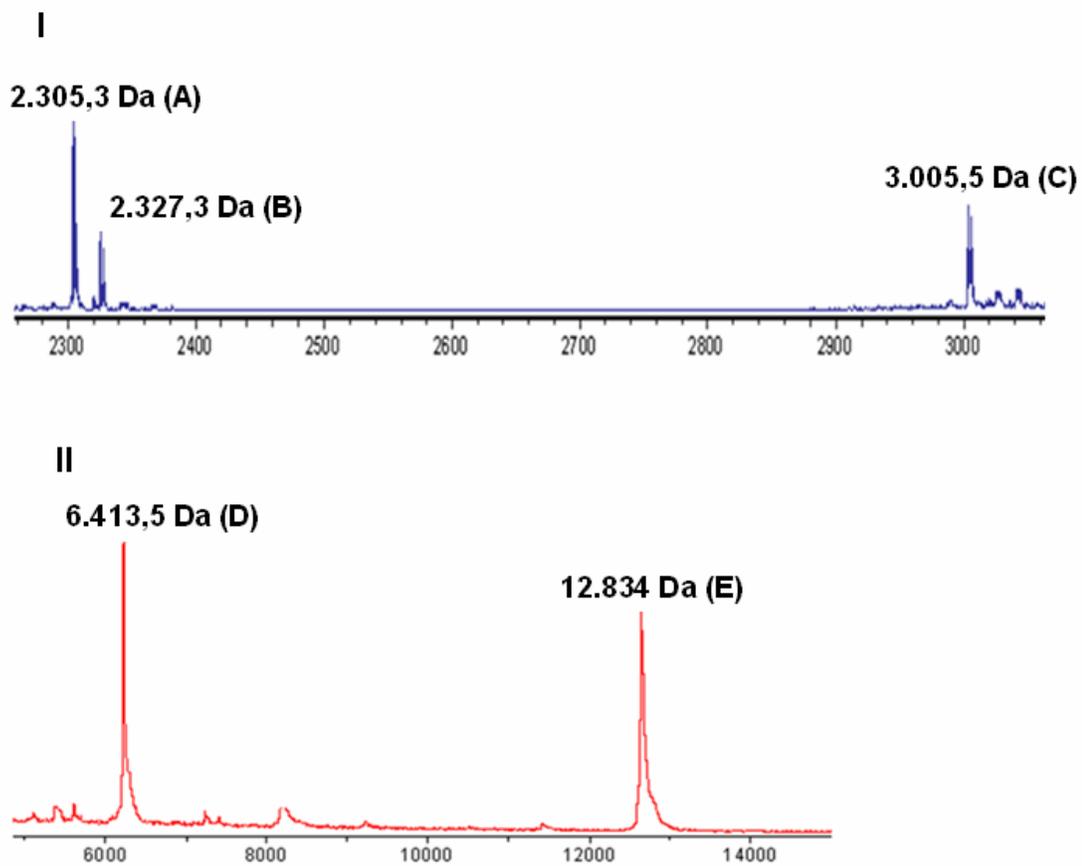


FIGURA 28: Análise da massa molecular das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185. I, espectrometria de massa MALDI-TOF dos peptídeos presentes nas frações finais 9, 10 e 11 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 40% de isopropanol). II, espectrometria de massa MALDI-TOF dos peptídeos presentes nas frações finais 13 e 14 (nas quais os peptídeos foram eluídos com cerca de 80% de isopropanol).

TABELA 11: Caracterização molecular das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185.

| Eluição dos Peptídeos | Massa Molecular (Da) | Sequência Parcial Obtida | Peptídeos ou Proteínas com Similaridade | Estirpe Produtora (número de acesso) |
|-----------------------|-------------------------------|--|--|--|
| 40% de isopropanol | 2.305,3 2.327,3 3.005,5 | SLLEQFTGK | Proteína Hipotética (MGIIAGIIKVIKSLIEQFTGK) | <i>S. aureus</i> USA300 (YP_001574361) |
| 80% de isopropanol | 6.413,5 12.834,5 | NNTSHNLPLGWFNVK NNLAQGTFNATK ALLYDER | Autolisina (1.245 ácidos aminados) Autolisina (1.245 ácidos aminados) Proteína Hipotética (144 ácidos aminados) | <i>S. aureus</i> , estirpe Newman (YP_001331956) <i>S. aureus</i> , estirpe Newman (YP_001331956) <i>S. aureus</i> RF122 (YP_416334) |

A análise da sequência SLLEQFTGK, presente em um peptídeo eluído com cerca de 40% de isopropanol, revelou identidade com o terminal carboxi de uma proteína hipotética de *S. aureus* USA300 (número de acesso: YP_001574361), de 21 ácidos aminados: MGIIAGIIVIKSLIEQFTGK. Esta proteína não apresentou similaridade com nenhuma proteína depositada no banco de dados do NCBI, segundo análises através do programa “Blast Conserved Domains”.

Já a análise das sequências dos peptídeos que foram eluídos com cerca de 80% de isopropanol revelou que as sequências NNTSHNLPLGWFNVK e NNLAQGTFNATK apresentam similaridade com um fragmento de um precursor de uma autolisina de *S. aureus*, estirpe Newman (número de acesso: YP_001331956), de 1.245 ácidos aminados. A sequência ALLYDER apresentou similaridade com um fragmento de uma proteína hipotética de *S. aureus* RF122 (número de acesso: YP_416334), de 144 ácidos aminados. Análises desta proteína hipotética, através do programa “Blast Conserved Domains”, revelou que ela apresenta domínio conservado com as proteínas MAP, enzimas envolvidas na sinalização intracelular (GOTOH & NISHIDA, 1998).

7. Cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185

A cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 (1.024 UB), contra a estirpe *M. luteus* ATCC 4698, foi determinada em um aparelho “Bioscreen C”, durante 4 h a 37°C.

Pôde-se observar uma redução da DO_{600} , de 1,5 para aproximadamente 0,5, em apenas 1 h, pela ação da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185, sugerindo que a estirpe indicadora, sofreu lise acentuada (FIGURA 29).

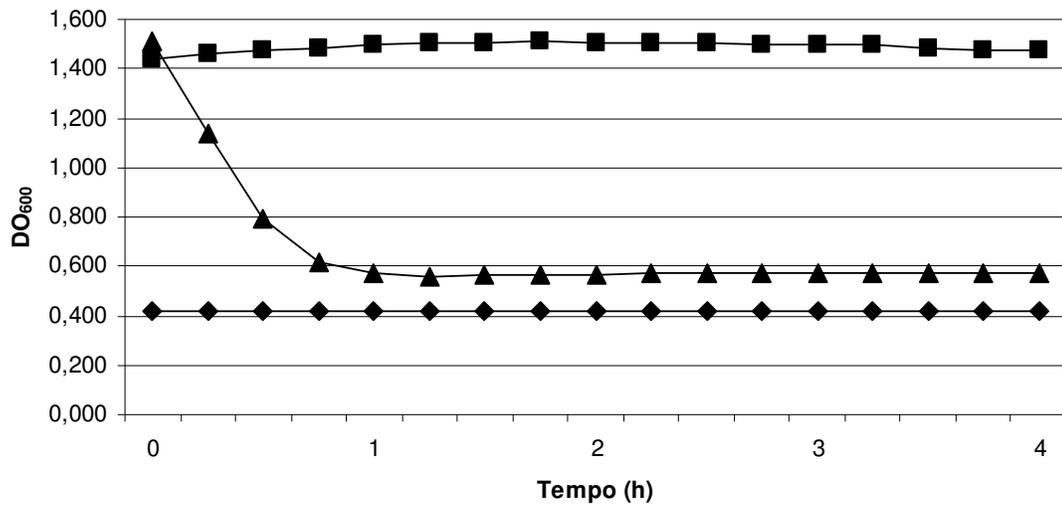


FIGURA 29: Cinética de atividade da(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe 4185 contra *M. luteus* ATCC 4698. A ação da(s) bacteriocina(s) sobre a estirpe indicadora foi acompanhada durante 4 h e quantificada pela leitura da DO (600 nm) da cultura. ◆GM17 (branco), ■, *M. luteus* ATCC 4698 (controle), ▲, *M. luteus* ATCC 4698 + bacteriocina(s) (1.024 UB). A figura mostra a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes.

DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior, foram identificadas 46 estirpes de *S. aureus*, isoladas de mastite bovina na região Sudeste do Brasil, produtoras de bacteriocinas. Dentre essas 46 estirpes, 34 produziam bacteriocinas semelhantes à aureocina A70 (CEOTTO, 2005).

As bacteriocinas produzidas pelas 12 estirpes restantes, que se mostraram diferentes da aureocina A70, também se mostraram diferentes das demais estafilococcinas produzidas por *S. aureus* descritas na literatura, já caracterizadas: aureocina A53 e estafilococcina C55 (CEOTTO, 2005).

Dando continuidade a este trabalho, a presença dos genes estruturais das estafilococcinas Pep5, epidermina, epicidina 280, epilancina K7 e simulancina 3299 nas 12 estirpes de *S. aureus* Bac⁺ foi investigada por PCR e por hibridação DNA/DNA. Os genes em questão, *pepA* (gene estrutural da Pep5), *ecilA* (gene estrutural da epicidina 280), *elkA* (gene estrutural da epilancina K7), *epiA* (gene estrutural da epidermina) e *simA* (gene estrutural da simulancina 3299) não foram detectados em nenhuma das 12 estirpes de *S. aureus* Bac⁺ envolvidas em mastite bovina. Estes resultados mostram que as bacteriocinas produzidas pelas referidas estirpes de fato são bacteriocinas inéditas.

Embora a aureocina A70 esteja disseminada entre as estirpes de estafilococos, a aureocina A53 foi isolada, pelo nosso grupo, somente uma vez (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990). A estafilococcina C55/BacR1 já foi isolada duas vezes (CRUPPER, GIES & IANDOLO, 1997; NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998). A epidermina parece ser o lantibiótico mais frequentemente produzido pelo grupo dos SCN, tendo sido isolado de diferentes estirpes de *S. epidermidis*, além de outras espécies de estafilococos (BIERBAUM *et al.*, 1996). A epicidina 280, produzida pela estirpe *S. epidermidis* BN 280, é considerada uma variante da Pep5 (HEIDRICH *et al.*, 1998), um lantibiótico produzido pela estirpe *S. epidermidis* 5 (KALETTA *et al.*, 1989). A epilancina K7 foi inicialmente isolada a partir da estirpe *S. epidermidis* K7 (VAN DE KAMP *et al.*, 1995b). Em 2005, a epilancina 15X, uma variante da epilancina K7, produzida pela estirpe *S. epidermidis* 15X154, foi descrita (EKKELENKAMP *et al.*, 2005). Duas diferentes variantes da nukacina ISK-1 também já foram descritas: warnericina RB4 (MINAMIKAWA *et al.*, 2005) e nukacina KQU-131 (WILAIPUN *et al.*, 2008).

Quando cultivadas em meio GM17, por 18 h a 37°C, as estirpes 4100, 4183 e 4230 apresentaram maior produção de bacteriocina (2.560 UB/ml), enquanto a estirpe 4185 apresentou a menor produção (160 UB/ml), dentre as estirpes testadas. Adicionalmente, todos os sobrenadantes testados apresentaram redução de pelo menos 94% da atividade antimicrobiana após o tratamento a 80°C, por 15 min, sugerindo que essas bacteriocinas são sensíveis à ação da temperatura. Provavelmente, essas substâncias não são lantibióticos, uma vez que a conformação desses peptídeos parece conferir rigidez e

resistência à ação do calor (MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; BASTOS *et al.*, 2009; BIERBAUM & SAHL, 2009).

Dentre as bacteriocinas produzidas pelas 12 estirpes de *S. aureus* envolvidas em mastite bovina, os produtos da estirpe 4185 se destacaram pela sua ação antagonística contra estirpes MRSA e SCN isolados de infecções nosocomiais, *Listeria*, inclusive *L. monocytogenes*, e também *B. cereus* - importantes patógenos alimentares. Uma vez que as bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 apresentam um potencial de aplicação biotecnológica, elas foram escolhidas para serem purificadas e caracterizadas.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são as principais colonizadoras da epiderme humana. Os estafilococos são responsáveis por diferentes quadros de infecções, sendo os principais causadores de infecções nosocomiais (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Além dos diversos fatores de virulência descritos em estirpes de *S. aureus*, um outro atributo dessas bactérias tem complicado o tratamento das infecções estafilocócicas: a sua resistência a múltiplos antibióticos, principalmente aos β -lactâmicos (DANCER, 2008).

A *L. monocytogenes* é um importante patógeno associado a alimentos. Esta bactéria pode ser transmitida através do contato com mãos, utensílios ou alimentos contaminados, especialmente em alimentos que são consumidos crus, como saladas (CARRASCO *et al.*, 2009; CORDANO & JACQUET, 2009).

O *B. cereus* é uma bactéria Gram-positiva, mesófila, aeróbio-facultativa e formadora de esporos. Pode ser encontrada com frequência no solo, em alimentos crus, secos ou processados. Também está apta a crescer no trato intestinal de insetos e de mamíferos e é reconhecida por causar intoxicações alimentares (STENFORS-ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008). A intoxicação por esta bactéria pode levar à diarreia ou à síndrome emética.

A diarreia causada por *B. cereus* é uma infecção causada pela produção de enterotoxina no intestino. A ingestão tanto de células viáveis como de esporos - que retomam a sua forma vegetativa no intestino - pode levar à diarreia. Três citotoxinas parecem estar associadas à diarreia: hemolisina BL (Hbl), enterotoxina não-hemolítica (Nhe) e citotoxina K. Já a síndrome emética está relacionada com a produção da toxina emética (ETE), sendo causada por intoxicação por alimentos que já possuem a toxina produzida pela bactéria (STENFORS ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Embora o *B. cereus* não seja patogênico, ele pode ser considerado um patógeno oportunista em indivíduos imunocomprometidos e neonatos, causando diferentes quadros de infecção, como pneumonia, endocardite, bacteriemia, septicemia ou ainda doenças periodontais. Alguns casos de pneumonia causada por *B. cereus* também já foram relatados (HOFFMASTER *et al.*, 2006).

Geralmente, casos de meningoencefalite neonatal estão associados à infecção do sistema nervoso central pelo vírus herpes simplex ou por bactérias, tais como *L.*

monocytogenes, *E. coli* e *S. agalactiae*. Porém, casos de meningoencefalite neonatal causados por *B. cereus* também têm sido relatados nos últimos anos (MANICKAM, KNORR & MULDREW, 2008).

As condições ótimas de produção das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 foram determinadas. Assim como outras estirpes de *S. aureus* Bac⁺ (NASCIMENTO *et al.*, 2004) e a estirpe *S. simulans* 3299, a estirpe 4185 apresentou o máximo da produção de bacteriocina entre o final da fase log e o início da fase estacionária do seu crescimento.

A sua purificação foi realizada a partir de 1 litro de sobrenadante da cultura da estirpe de *S. aureus* 4185 crescida em meio GM17, através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e HPLC. A estratégia empregada para a purificação das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 foi a comumente empregada para este fim (NETZ *et al.*, 2001; NETZ *et al.*, 2002; BREDE *et al.*, 2004) e mostrou-se eficiente devido às propriedades dos peptídeos purificados. Assim como a maioria das bacteriocinas (BASTOS *et al.*, 2009), incluindo a simulancina 3299, eles se mostraram hidrofóbicos e catiônicos.

Após a purificação através de HPLC, foi observada a presença de atividade antimicrobiana em diferentes frações, eluídas com 40% e 80% de isopropanol, sugerindo que a atividade encontrada no sobrenadante da estirpe 4185 estaria relacionada com a presença de pelo menos dois peptídeos distintos. Adicionalmente, pôde-se inferir que os peptídeos eluídos com 80% de isopropanol devem ser altamente hidrofóbicos.

Embora a maioria das estirpes Bac⁺ caracterizadas produzam uma única bacteriocina como, por exemplo, as estirpes *S. aureus* A70 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990), *S. aureus* A53 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990), *S. simulans* 3299 (este trabalho) e *S. aureus* 5 (KALETTA *et al.*, 1989), entre outras, uma única estirpe bacteriana pode produzir mais de uma bacteriocina (QUADRÌ *et al.*, 1997).

A determinação da massa molecular dos peptídeos purificados revelou a presença de cinco componentes com massa molecular distintas: 2.305,3 ± 1,5 Da (peptídeo A), 2.327,3 ± 1,5 Da (peptídeo B), 3.005,5 ± 1,5 Da (peptídeo C), 6.413,5 ± 1,5 Da (peptídeo D) e 12.834,5 ± 1,5 Da (peptídeo E).

Apenas uma sequência, SLLEQFTGK, foi obtida a partir das frações eluídas com cerca de 40% de isopropanol, revelando identidade com o terminal carboxi de uma proteína hipotética de 21 ácidos aminados, com função desconhecida e uma massa molecular em torno de 2.300 Da, similar às massas dos peptídeos A (2.305,3 ± 1,5 Da) e B (2.327,3 ± 1,5 Da).

O peptídeo C (3.005,5 ± 1,5 Da) deve possuir uma sequência de cerca de 28 ácidos aminados; entretanto, esta sequência não pôde ser determinada.

É possível ainda que uma das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 seja composta por mais de um componente, como a aureocina A70 (NETZ *et al.*, 2001), a

estafilococcina C55 (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998) e a lactococcina G (NISSEN-MEYER *et al.*, 1992).

A partir das frações eluídas com cerca de 80% de isopropanol, foram obtidas três sequências parciais de ácidos aminados. A primeira sequência, ALLYDER, apresentou similaridade com um fragmento de uma proteína hipotética de 144 ácidos aminados, de função desconhecida, mas com um domínio conservado com as proteínas MAP, enzimas envolvidas na sinalização intracelular (GOTOH & NISHIDA, 1998). A massa desta proteína foi estimada em 15.854,24 Da, através do programa “Peptide Mass” (“ExPASy Proteomics Server”, <http://ca.expasy.org>). Empregando-se este mesmo programa, também pôde-se analisar os fragmentos que seriam gerados pela sua digestão com tripsina. Nenhum dos fragmentos hipotéticos apresentaria massa molecular de 6,4 ou de 12,8 KDa (como os peptídeos D e E). Logo, é improvável que um destes peptídeos seja relacionado à referida proteína hipotética.

Duas outras sequências, NNTSHNLPLGWFNVK e NNLAQGTFNATK, apresentaram similaridade com um fragmento de um precursor de uma autolisina de *S. aureus*, de 1.245 ácidos aminados. As autolisinas descritas na literatura são proteínas grandes (50-100 kDa), que atuam sobre a parede celular das bactérias Gram-positivas (VOLLMER *et al.*, 2008). Porém, apenas dois componentes, peptídeo D ($6.413,5 \pm 1,5$ Da) e peptídeo E ($12.834,5 \pm 1,5$ Da), foram encontrados nessas frações. Portanto, é pouco provável que a substância antimicrobiana purificada seja uma autolisina. Curiosamente, o peptídeo E apresenta massa correspondente ao dobro da massa do peptídeo D. O peptídeo E poderia ser um dímero de peptídeos D, ou ainda, o peptídeo D poderia ser um produto da clivagem do peptídeo E.

A determinação da cinética de atividade das bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 foi determinada, contra a estirpe *M. luteus* ATCC 4698, empregando-se a bacteriocina dez vezes concentrada com sulfato de amônio. Pôde-se observar que a estirpe *M. luteus* ATCC 4698 sofreu lise acentuada pela ação dos peptídeos antimicrobianos. Estes resultados sugerem que, em conjunto, as bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 apresentam atividade bacteriolítica. Embora o modo de ação de cada um dos peptídeos, individualmente, não tenha sido determinado, é possível que pelo menos um deles seja bacteriolítico.

A nisina e outros lantibióticos têm atividade bacteriolítica. Esta bacteriocina se liga especificamente ao lipídeo II, levando à formação de poros na membrana celular e à inibição da biossíntese da parede celular das células sensíveis (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Em geral, as bacteriocinas de classe II agem permeabilizando a membrana das células sensíveis. O seu terminal amino se liga à membrana das células-alvo através de interações eletrostáticas com estruturas negativamente carregadas. As bacteriocinas do tipo pediocina, como a pediocina PA1 (protótipo do grupo), por exemplo, se ligam ao receptor de

manose. Em seguida, o terminal carboxi, mais hidrofóbico, penetra na bicamada lipídica. Consequentemente, ocorre o efluxo de pequenas moléculas, como ATP, e a dissipação do potencial de membrana, resultando na morte celular (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

A aureocina A53 é um exemplo de bacteriocina que parece se ligar inespecificamente à membrana das células sensíveis, permeabilizando esta estrutura e levando à lise e à morte celular (NETZ, BASTOS & SAHL, 2002).

Uma variante da aureocina A53, a lacticina Q - produzida pela estirpe *Lactococcus lactis* QU5 -, também apresenta ação bacteriolítica contra bactérias Gram-positivas, agindo em concentrações nanomolares e se ligando inespecificamente à membrana das células-alvo. O modelo proposto por Yoneyama *et al.* (2009a) inclui etapas principais da atividade desta bacteriocina: i, a sua ligação (em uma conformação helicoidal) à membrana bacteriana negativamente carregada; ii, penetração nesta membrana, sem o auxílio de uma molécula específica de ligação; e iii, morte celular pela perda dos componentes do citoplasma. A lacticina Q parece ser capaz de gerar grandes danos à membrana das células sensíveis, além de se translocar por esta estrutura em associação ao movimento de “flip-flop” da bicamada lipídica (YONEYAMA *et al.*, 2009b).

Dentre as bacteriocinas da classe III, as bacteriolisinas (subclasse IIIa) também apresentam atividade bacteriolítica, característica que dá nome ao grupo. A lisostafina é um exemplo de bacteriolisina, que age através da hidrólise do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas (BASTOS *et al.*, 2009).

Geralmente, os determinantes genéticos das bacteriocinas são encontrados em plasmídeos (ex.: simulancina 3299) embora possam estar codificados no cromossomo da célula bacteriana (ex.: epilancina K7) (VAN DE KAMP *et al.*, 1995b; MCAULIFFE, ROSS & HILL, 2001).

A estirpe 4185 apresenta um único plasmídeo, de 11,5 kb (CEOTTO *et al.*, 2009). Os grupamentos genéticos envolvidos na biossíntese das aureocinas 4185 podem estar localizados no referido plasmídeo, ou ainda no cromossomo da estirpe produtora.

Assim como outras bacteriocinas, os peptídeos antimicrobianos produzidos pela estirpe *S. aureus* 4185 poderiam ser utilizados, na sua forma purificada, na prevenção e no combate às infecções estafilocócicas, uma vez que foram capazes de inibir estirpes de *Staphylococcus* spp. envolvidos em infecções nosocomiais. Essas bacteriocinas poderiam ainda ser empregadas como biopreservativos de alimentos devido a sua ação contra bactérias do gênero *Listeria* (incluindo *L. monocytogenes*) e *B. cereus*. Embora as bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 tenham se mostrado sensíveis a tratamentos a 80°C, essas bacteriocinas poderiam ser utilizadas na conservação de alimentos que são consumidos crus ou minimamente processados, como saladas. Alternativamente, a bacteriocina poderia ser adicionada aos alimentos após o seu processamento. No caso do leite, por exemplo, as bacteriocinas poderiam ser adicionadas após a sua pasteurização.

CONCLUSÕES

- ✓ As 12 estirpes Bac⁺ produzem estafilococcinas distintas das já descritas na literatura.
- ✓ As estirpes 3853, 3913, 3959, 4045, 4046, 4093, 4100, 4150, 4180, 4183 e 4230 foram capazes de inibir somente *M. luteus* ATCC 4698.
- ✓ As bacteriocinas produzidas pela estirpe *S. aureus* 4185 foram capazes de inibir importantes patógenos alimentares e estirpes envolvidas em infecções nosocomiais.
- ✓ As bacteriocinas produzidas pelas 12 estirpes de *S. aureus* apresentaram redução significativa da atividade antimicrobiana após o tratamento a 80°C, por 15 min, sugerindo que essas bacteriocinas não devem ser lantibióticos.
- ✓ A produção das aureocinas 4185 é maior quando a estirpe 4185 é cultivada em meio GM17, do que quando a estirpe 4185 é cultivada em BHI.
- ✓ Após 8 h, no final da fase log de crescimento bacteriano, pôde-se detectar a produção máxima destas bacteriocinas em ambos os meios.
- ✓ A atividade antimicrobiana encontrada no sobrenadante da estirpe 4185 parece estar relacionada com a presença de pelo menos dois peptídeos distintos.
- ✓ A determinação da massa molecular dos peptídeos purificados revelou a presença de cinco componentes com massa molecular distintas: 2.305,3 ± 1,5 Da (peptídeo A), 2.327,3 ± 1,5 Da (peptídeo B), 3.005,5 ± 1,5 Da (peptídeo C), 6.413,5 ± 1,5 Da (peptídeo D) e 12.834,5 ± 1,5 Da (peptídeo E).
- ✓ Apenas uma sequência de ácidos aminados, SLLEQFTGK, foi obtida a partir das frações eluídas com cerca de 40% de isopropanol.
- ✓ A partir das frações eluídas com cerca de 80% de isopropanol, foram obtidas três sequências parciais de ácidos aminados: ALLYDER, NNTSHNLPLGWFNVK e NNLAQGTFNATK.
- ✓ Em conjunto, as bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 apresentam atividade bacteriolítica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Duas diferentes estratégias de genética reversa serão empregadas a fim de se identificar os determinantes genéticos possivelmente envolvidos com as funções antimicrobianas detectadas na estirpe 4185:

- ✓ a primeira estratégia consiste na detecção, no DNA cromossômico, dos genes envolvidos na produção das bacteriocinas e
- ✓ a segunda estratégia consiste na pesquisa desses genes no DNA plasmidial isolado da estirpe de *S. aureus* 4185.

Adicionalmente serão realizadas:

- ✓ Clonagem do grupamento genético relativo a cada bacteriocina, separadamente, em vetores para expressão em *S. aureus*;
- ✓ a análise de expressão dos genes envolvidos na biossíntese das bacteriocinas (através de “northern blot”) e
- ✓ a determinação do espectro de ação dessas bacteriocinas sobre outras estirpes bacterianas isoladas de alimentos.

CAPÍTULO III: Purificação e caracterização da aureocina 4181

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

A análise de imunidade cruzada contra a estirpe *S. aureus* A70, produtora da aureocina A70, a amplificação do operon *aurABCD* (que codifica a referida aureocina) e a sua detecção por hibridação DNA/DNA revelaram que a bacteriocina produzida pela estirpe *S. aureus* 4181 (isolada de mastite bovina) parece ser uma variante da aureocina A70 (CEOTTO, 2005). Os genes que codificam esta bacteriocina, designada aureocina 4181, estão localizados em um plasmídeo de aproximadamente 8,5 kb (CEOTTO *et al.*, 2009), designado pRJ80.

O espectro de ação da aureocina 4181 sugere que esta bacteriocina apresenta um potencial de aplicação biotecnológica na prevenção e no controle de infecções estafilocócicas, uma vez que esta estafilococcina apresentou atividade contra estirpes clínicas de MRSA e de SCN, contra as quais a aureocina A70 não demonstrou atividade (CEOTTO, 2005). Devido a este potencial de aplicação, a aureocina 4181 foi escolhida para ser estudada. Portanto, o objetivo principal desta parte trabalho foi purificar e caracterizar a aureocina 4181.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS

1. Comparar as aureocinas 4181 e A70.

Abordagens experimentais: determinação do espectro de ação e da cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70.

2. Determinar as melhores condições de produção da aureocina 4181.

Abordagem experimental: cinética de produção da aureocina 4181.

3. Purificar a aureocina 4181.

Abordagens experimentais: obtenção da bacteriocina a partir do sobrenadante da cultura da estirpe 4181, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e HPLC.

4. Caracterizar a aureocina 4181.

Abordagens experimentais: determinação da massa molecular, através de espectrometria de massa MALDI-TOF, e da sequência dos ácidos aminados da aureocina 4181, através de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF, e identificação de regiões de similaridade entre as sequências de ácidos aminados obtidas e as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI.

5. Análisar a sequência do operon *aurABCD*, presente no pRJ80.

Abordagens experimentais: amplificação do operon *aurABCD* presente no plasmídeo, por PCR, clonagem, sequenciamento do amplicon obtido e alinhamento da sequência obtida com a do operon *aurABCD*, codificado pelo plasmídeo pRJ6, através do programa "ClustalW2™".

6. Comparar os plasmídeos pRJ80 e pRJ6.

Abordagens experimentais: análise dos plasmídeos pRJ6 e pRJ80 digeridos com as endonucleases de restrição *BglII*, *Clal*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* e *PstI*, e hibridação DNA/DNA dos fragmentos obtidos, empregando-se o pRJ6 purificado, como sonda.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Estirpes e condições de crescimento

A estirpe *S. aureus* 4181, isolada de mastite bovina na região Sudeste do Brasil, foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Aparecida Vasconcelos de Paiva Brito, da Embrapa Gado do Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

A estirpe *S. aureus* A70, produtora da aureocina A70, isolada de leite comercial (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990), foi utilizada para a produção desta bacteriocina. Outras estirpes foram utilizadas como indicadoras: *M. luteus* ATCC 4698, *S. aureus* A70 Bac⁻ [estirpe A70 curada do plasmídeo pRJ6 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990)], *S. aureus* A53 [produtora da aureocina A53 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990)], *S. aureus* 4, *S. epidermidis* 102Hp, *S. epidermidis* 118 e *S. haemolyticus* 69Hp (TABELA 9).

As estirpes foram crescidas em meio TSB, BHI ou GM17, a 37°C. Os meios de cultura foram utilizados nas formas líquida, semissólida e sólida.

2. Determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70

A fim de se confirmar a diferença do espectro de ação entre as aureocinas 4181 e A70, a atividade destas substâncias foi testada contra as estirpes: *M. luteus* ATCC 4698, sabidamente sensível às estafilococcinas (controle de produção de bacteriocinas), *S. aureus* A70 Bac⁻ (sensível à aureocina A70), *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118, estirpes clínicas sensíveis à ação da aureocina 4181, mas resistentes à ação da aureocina A70 (CEOTTO, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2006), além de *S. epidermidis* 102Hp e *S. haemolyticus* 69Hp, estirpes clínicas produtoras de biofilme (POTTER *et al.*, 2009).

A atividade antimicrobiana destas substâncias foi testada por difusão em ágar e pelo teste de atividade em placa de microdiluição.

2.1. Determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 em meio sólido

O espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 foi determinado conforme descrito por Giambiagi-deMarval *et al.* (1990), em placas contendo meio GM17. Cinco microlitros de cultura das estirpes 4181 e A70, na fase log de crescimento, crescidas em 5 ml de meio GM17 a 37°C, foram inoculados sob forma de pontos na superfície de placas contendo meio GM17 sólido. Após 18 h de incubação a 37°C, as bactérias foram mortas através da exposição aos vapores de clorofórmio por 30 min e, em seguida, foram vertidos sobre a placa 3 ml de meio GM17 semissólido contendo 0,3 ml das estirpes indicadoras (cultivadas em 5 ml de meio GM17, a 37°C por 18 h, e diluídas dez vezes em solução salina estéril). As placas foram incubadas por 18 h a 37°C e verificou-se a produção das bacteriocinas através da formação de halos de inibição ao redor do crescimento.

2.2. Determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 em placa de microdilução

O teste em placa de microdilução foi realizado empregando-se 1.024 UB das aureocinas 4181 e A70 (item 2.2, CAPÍTULO I). Quatro estirpes foram empregadas como indicadoras: *M. luteus* ATCC 4698, *S. aureus* A70 Bac⁻, *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118.

As estirpes *S. epidermidis* 102Hp e *S. haemolyticus* 69Hp são fortemente produtoras de biofilme e, portanto, se aderem à placa de poliestireno (POTTER *et al.*, 2009). A produção de biofilme dificultaria a interpretação dos resultados obtidos por microdilução. Por isso, estas estirpes não foram empregadas na determinação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 por este método.

3. Cinética de produção da aureocina 4181

A fim de se definir as melhores condições de produção da aureocina 4181, a estirpe *S. aureus* 4181 foi cultivada em dois meios distintos: GM17 e BHI, a 37°C por 24 h. A produção da aureocina 4181 foi determinada através do teste de atividade em placa de microdilução, conforme descrito no item 2.2 (CAPÍTULO I), após 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h e 24 h de crescimento da estirpe 4181, tanto em meio GM17 como em meio BHI.

4. Cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70

A cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70 foi determinada conforme descrito no item 6 (CAPÍTULO I).

5. Purificação da aureocina 4181

A purificação da aureocina 4181 foi realizada através de: obtenção da bacteriocina no sobrenadante da cultura da estirpe 4181 (item 4.1, do CAPÍTULO I), precipitação com sulfato de amônio (item 5.2, CAPÍTULO II), cromatografia de troca catiônica (item 4.3, CAPÍTULO I) e HPLC (item 4.4, CAPÍTULO I).

6. Caracterização molecular da aureocina 4181

A caracterização molecular da aureocina 4181 foi realizada através da determinação da sua massa molecular e do sequenciamento dos seus ácidos aminados, conforme descrito no CAPÍTULO II (item 6).

O programa “Blastn” foi utilizado a fim de se procurar regiões de similaridade entre as sequências de ácidos aminados obtidas e as sequências de peptídeos depositadas no banco de dados do NCBI.

7. Comparação da sequência do operon *aurABCD*, presente nos plasmídeos pRJ80 e pRJ6

O operon *aurABCD* presente no plasmídeo pRJ80 foi amplificado por PCR, clonado e sequenciado. A sequência obtida foi comparada com a sequência do operon *aurABCD* codificado pelo plasmídeo pRJ6, através do programa "ClustalW2™".

7.1. Amplificação do operon *aurABCD* presente no plasmídeo pRJ80

As reações de PCR foram realizadas conforme descrito no item 11 (CAPÍTULO I). Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores "forward" orfBF (5'GTTAATTAGGTCTTTTGGC3') e "reverse" aurTR (5'GCTCTCCAACCTTTTCATTTGAATC3'), garantindo que todo o operon *aurABCD* fosse amplificado. O anelamento ocorreu a 45°C e o plasmídeo pRJ80, purificado (item 9.1, CAPÍTULO I), foi empregado como molde. O plasmídeo pRJ6, purificado, foi utilizado como controle positivo. O plasmídeo pRJ9 (codificador da aureocina A53), purificado, foi utilizado como controle negativo de reação.

7.2. Clonagem do operon *aurABCD*

O amplicon obtido no item 7.1 foi purificado, dosado e clonado, e no vetor pGEM T-Easy e transferido para *E.coli* DH5- α , conforme descrito nos itens 12 e 13 (CAPÍTULO I).

7.3. Análise dos transformantes obtidos

O DNA plasmidial de seis transformantes obtidos foi isolado (item 9.1, CAPÍTULO I) e empregado como molde para a amplificação do fragmento clonado, por PCR (como descrito no item 7.1), visando-se a detecção da presença do inserto. Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores orfBF e aurTR.

7.4. Sequenciamento do operon *aurABCD*

O sequenciamento dos fragmentos obtidos foi realizado conforme descrito no item 14 (CAPÍTULO I).

A reação de sequenciamento continha 150 ng do DNA plasmidial (dosado conforme descrito no item 12 do CAPÍTULO I) dos transformantes obtidos, 0,35 μ l do oligonucleotídeo iniciador empregado (3,2 pmol; orfBF ou aurTR), 15 μ l de água Milli-Q e 2,5 μ l do sistema comercial "ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing".

7.5. Análises, *in silico*, da sequência do operon *aurABCD*

As sequências do operon *aurABCD* (item 7.4) foram alinhadas pelo programa "ClustalW2™" e, a partir deste alinhamento, foi obtida uma sequência-consenso. A sequência-consenso obtida, correspondente ao operon *aurABCD* (codificado pelo plasmídeo

pRJ80), foi alinhada e comparada com a sequência do operon *aurABCD*, codificada pelo plasmídeo pRJ6, também através do programa "ClustalW2™".

8. Comparação dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6

8.1. Análises, *in silico*, do plasmídeo pRJ6

Foram realizadas análises *in silico*, com o programa "NEBcutter V2.0", a fim de se identificar os sítios de restrição presentes no pRJ6 para as endonucleases comercializadas, bem como o tamanho esperado dos fragmentos de DNA, após a sua digestão com as referidas enzimas. As análises foram feitas com a sequência do plasmídeo pRJ6, de 7.904 pb, depositada no "GenBank" (número de acesso: AF241888).

8.2. Digestão do DNA plasmidial

Os plasmídeos pRJ80 e pRJ6 foram purificados (item 9.1, CAPÍTULO I) e digeridos com as endonucleases de restrição: *Bgl*II (New England Biolabs), *Cla*I (Takara), *Eco*RI (New England Biolabs), *Eco*RV (Promega), *Hind*III (New England Biolabs) e *Pst*I (New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante.

As digestões foram realizadas a 37°C, por 4 h, empregando-se 500 ng de DNA plasmidial (dosado conforme descrito no item 12 do CAPÍTULO I), 20 unidades de cada uma das enzimas, no seu respectivo tampão, em um volume total de 30 µl.

8.3. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos pRJ6 e pRJ80 digeridos

Os produtos das digestões dos plasmídeos pRJ6 e pRJ80 (item 8.2) foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,7% (p/v), preparado em tampão TAE, visualizados e registrados. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V durante uma hora. Foram utilizados 30 µl do produto da digestão e 5 µl de corante para eletroforese.

8.4. Hibridação DNA/DNA

Os géis de agarose contendo os produtos das digestões dos plasmídeos pRJ6 e pRJ80 (item 8.3) foram tratados, conforme descrito no item 10 (CAPÍTULO II), e o DNA foi transferido, por capilaridade, para uma membrana de náilon. Esta membrana foi lavada em uma solução SSC (seis vezes concentrada), secada (80°C, por 2 h, em forno pré-aquecido) e armazenada à temperatura ambiente, até o momento do uso. O restante do gel foi corado em solução de EtBr e visualizado, para se verificar se a transferência de DNA havia sido completa.

O plasmídeo pRJ6, purificado (item 9.1, CAPÍTULO I) e marcado com α -³²P-dCTP, foi empregado como sonda. Os produtos das digestões deste mesmo plasmídeo foram empregados como controle positivo.

Tanto a marcação da sonda com a as hibridações de DNA/DNA foram realizadas empregando-se também o sistema comercial “Redprime II Random Prime Labelling System”. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos antes da hibridação, com o sistema “ProbeQuant™ G-50 Micro Columns”. A hibridação foi revelada por exposição ao filme de raio-X “Hyperfilm”, durante 1 h (item 8, CAPÍTULO II).

RESULTADOS

1. Comparação do espectro de ação das aureocinas 4181 e A70

A fim de se confirmar a diferença do espectro de ação entre as aureocinas 4181 e A70, a atividade destas bacteriocinas (concentradas por precipitação com sulfato de amônio) foi testada contra as estirpes *M. luteus* ATCC 4698, *S. aureus* A70 Bac⁻, *S. aureus* 4, *S. epidermidis* 118, *S. epidermidis* 102Hp e *S. haemolyticus* 69Hp.

Nos testes realizados em meio sólido, a aureocina A70 só foi capaz de inibir as estirpes *S. aureus* A70 Bac⁻ (estirpe A70 curada do plasmídeo pRJ6) e *M. luteus* ATCC 4698, empregada como controle positivo da produção de bacteriocinas. Já a aureocina 4181 foi capaz de inibir o crescimento de todas as estirpes testadas, com halos de inibição que variaram entre 20 e 32 mm (FIGURA 30), confirmando os resultados obtidos anteriormente por Ceotto (2005) e Nascimento *et al.* (2006).

Já nos testes realizados em placas de microdiluição, apenas quatro estirpes foram empregadas como indicadoras: *M. luteus* ATCC 4698, *S. aureus* A70 Bac⁻, *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118. Ambas as bacteriocinas testadas, aureocina A70 e aureocina 4181, foram capazes de inibir as estirpes *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118 (TABELA 12), sugerindo que estes testes foram mais sensíveis do que os testes realizados em meio sólido. Além disso, estes resultados sugerem que os *Staphylococcus* spp. mostraram-se menos sensíveis do que o *M. luteus*, já que a atividade contra as bactérias deste gênero mostrou-se menor.

Apesar da aureocina A70 também ter inibido as estirpes clínicas, nos testes realizados em placas de microdiluição, a aureocina 4181 mostrou-se mais eficaz. A estirpe *S. aureus* 4 mostrou-se quatro vezes mais sensível e a estirpe *S. epidermidis* 118 mostrou-se duas vezes mais sensível à aureocina 4181, do que à ação da aureocina A70.

2. Cinética de produção da aureocina 4181

A cinética da produção da aureocina 4181 foi determinada nos meios BHI e GM17, por 24 h (FIGURA 31). Entre 6 e 8 h de crescimento, pôde-se detectar a produção máxima desta bacteriocina: em meio BHI, a estirpe 4181 produziu 160 UB/ml. Já com 6 h de crescimento e em meio GM17, foram produzidas 640 UB/ml, com 8 h. Uma vez que a produção de aureocina 4181 foi quatro vezes maior em meio GM17, após 8 h de crescimento, este meio foi selecionado para as etapas seguintes deste trabalho.

Após 24 h de crescimento, houve uma redução de 50% da atividade de bacteriocina (80 UB/ml), quando comparada com a atividade quantificada após 12 h de crescimento, em meio BHI (160 UB/ml). Em meio GM17, pôde-se observar uma redução de 87,5% da atividade de bacteriocina (80 UB/ml), quando comparada com a atividade quantificada após 12 h de crescimento (640 UB/ml) - FIGURA 31.



FIGURA 30: Inibição de *S. aureus* 69Hp pelas estirpes *S. aureus* A70 e *S. aureus* 4181.

TABELA 12: Comparação do espectro de ação das aureocinas A70 e 4181, através de testes realizados em placas de microdiluição.

| Estirpe Indicadora | Atividade da Aureocina A70 (UB/ml) | Atividade da Aureocina 4181 (UB/ml) |
|---|---|--|
| <i>M. luteus</i> ATCC 4698 | 1.024 | 1.024 |
| <i>S. aureus</i> A70 Bac^c | 320 | 640 |
| <i>S. aureus</i> 4 | 160 | 640 |
| <i>S. epidermidis</i> 118 | 320 | 640 |

* A tabela mostra os resultados obtidos em três experimentos independentes. Não houve desvio-padrão.

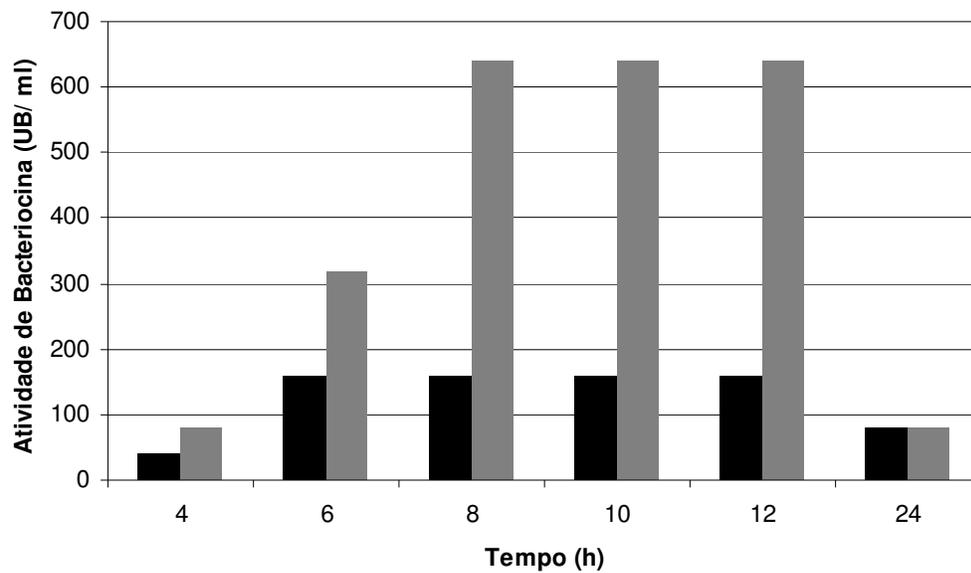


FIGURA 31: Cinética de produção da aureocina 4181 nos meios BHI e GM17. Barras pretas, atividade da aureocina 4181 produzida em meio BHI; barras cinzas, atividade da aureocina 4181 produzida em meio GM17. Em ambos os casos, a estirpe *M. luteus* ATCC 4698 foi empregada como indicadora. A figura mostra a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes.

3. Comparação da cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70

A cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70, contra a estirpe *M. luteus* ATCC 4698, foi determinada em um aparelho “Bioscreen C”, durante 4 h a 37°C.

Pôde-se observar uma redução da DO₆₀₀, de 1,3 para aproximadamente 0,4, em apenas 1 h, pela ação da aureocina 4181, sugerindo que a estirpe indicadora sofreu lise acentuada. Também pôde-se observar uma redução da DO₆₀₀, de 1,4 para aproximadamente 1,0, em 4 h, pela ação da aureocina A70, sugerindo que a cultura da estirpe indicadora sofreu lise parcial pela ação desta bacteriocina (FIGURA 32).

4. Purificação da aureocina 4181

A purificação da aureocina 4181 foi realizada através de: obtenção da bacteriocina no sobrenadante da cultura da estirpe 4181, crescida em meio GM17, por 12 h, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e duas corridas de HPLC.

Um litro do sobrenadante da estirpe 4181 foi precipitado com 40% (p/v) de sulfato de amônio e dissolvido em 100 ml de água Milli-Q estéril. Esta solução, contendo 512.000 UB, foi submetida à cromatografia de troca catiônica. O eluato desta cromatografia foi recolhido em frações de 10 ml. A bacteriocina foi eluída, predominantemente, em duas frações de NaCl 0,5 M em um total de 128.800 UB (25% da aureocina 4181 foram recuperados). Estas duas frações (20 ml) foram submetidas à HPLC.

A primeira corrida de HPLC foi realizada, empregando-se a coluna “Resource RPC 1-ml”. A bacteriocina foi eluída em um gradiente de água e isopropanol (contendo 0,1% de TFA), em 24 frações de 1 ml. As frações 13, 14 e 15 apresentaram atividade antimicrobiana, em um total de 55.600 UB (43,2% de recuperação), que foram submetidas a uma segunda HPLC.

Após a segunda corrida de HPLC, na coluna “Sephasil Peptide C₈”, a aureocina 4181 foi eluída em um gradiente de água e isopropanol (contendo 0,1% de TFA), em 30 frações de 500 µl. Dois picos de eluição puderam ser observados em 65% de isopropanol, nas frações 14 e 15 (FIGURA 33). Nestas frações, 28,8% da aureocina 4181 aplicada na coluna foram recuperados (16.000 UB).

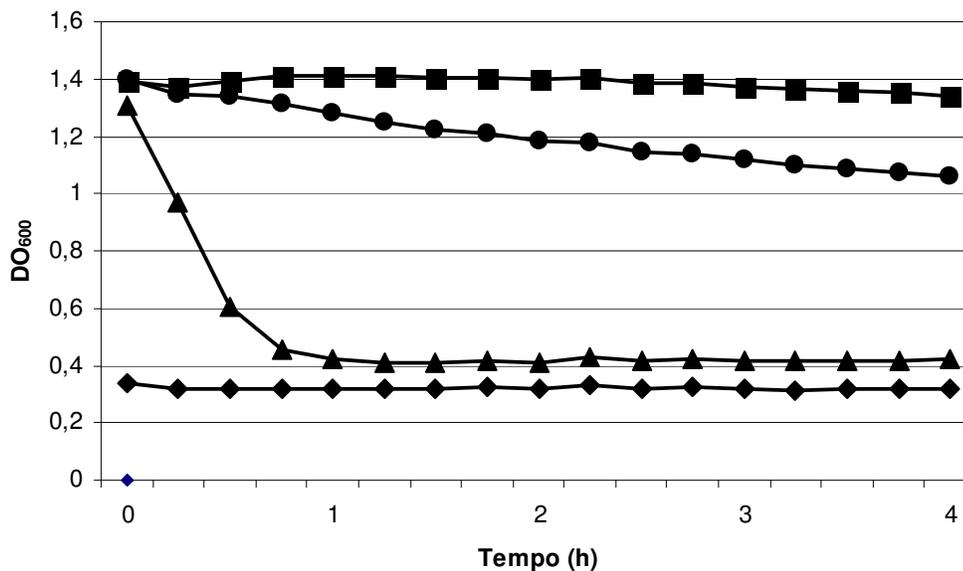


FIGURA 32: Cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70 contra *M. luteus* ATCC 4698. A ação das bacteriocinas sobre a estirpe indicadora foi acompanhada durante 4 h e quantificada pela leitura da DO (600 nm) da cultura. ◆GM17 (branco), ■, *M. luteus* ATCC 4698 (controle), ▲, *M. luteus* ATCC 4698 + aureocina 4181 (1.024 UB), ● *M. luteus* ATCC 4698 + aureocina A70 (1.024 UB). A figura mostra a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes.

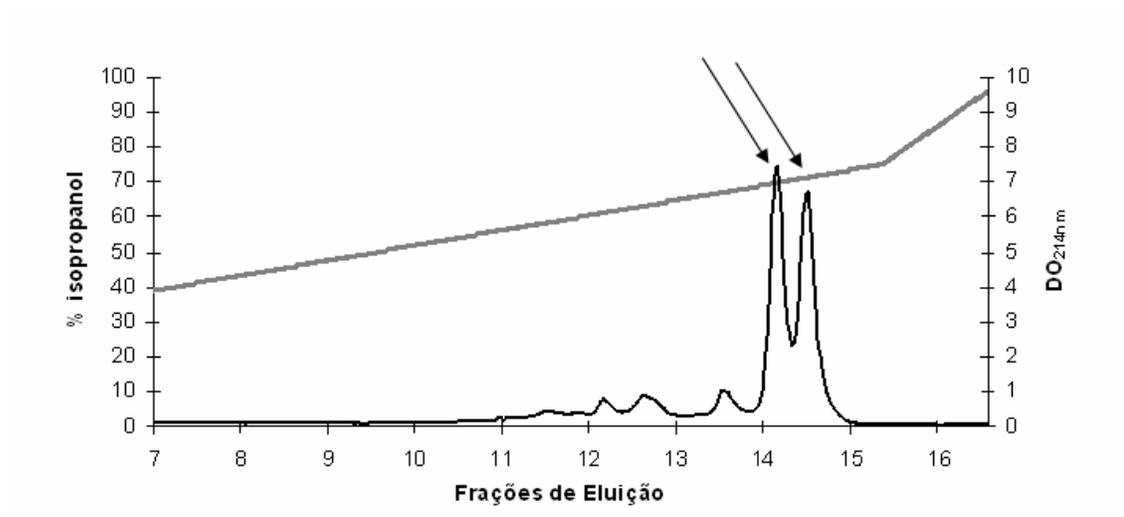


FIGURA 33: Purificação da aureocina 4181 através de HPLC. Eluição da aureocina 4181 em um gradiente de água e isopropanol (0 a 100%), contendo 0,1% TFA, após HPLC na coluna “Sephasil Peptide C₈”, registrada a 214 nm. As setas indicam as frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana. Linha cinza, concentração de isopropanol.

5. Caracterização molecular da aureocina 4181

As frações 14 e 15 obtidas a partir da segunda corrida de HPLC foram empregadas para a determinação da massa molecular e para o sequenciamento dos ácidos aminados da aureocina 4181, por espectrometria de massa MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF, respectivamente.

A análise da espectrometria de massa das duas frações (14 e 15) revelou a presença de uma mistura de componentes (FIGURA 34). Três destes componentes (com massa molecular de $2.981,7 \pm 1,5$ Da, $3.108,6 \pm 1,5$ Da e $3.147,8 \pm 1,5$ Da) estavam presentes em ambas as frações. Adicionalmente, um componente de $2.951,7 \pm 1,5$ Da foi detectado na fração 15 e outros dois componentes, de $2.824,4 \pm 1,5$ Da e $3.179,8 \pm 1,5$ Da, foram detectados na fração 14. Nenhum deles apresentou massa molecular correspondente aos peptídeos da aureocina A70, produzida pela estirpe isolada de leite *S. aureus* A70: AurA, AurB, AurC e AurD, de $2.927,3 \pm 1,5$ Da, $2.795,7 \pm 1,5$ Da, $2.954,8 \pm 1,5$ Da e $3.087,7 \pm 1,5$ Da, respectivamente (NETZ *et al.*, 2001). Os peptídeos encontrados apresentaram um aumento na massa molecular entre 21 e 28 Da, em relação aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD.

O sequenciamento dos ácidos aminados dos componentes encontrados, por espectrometria de massa, revelou quatro sequências parciais (TABELA 13). A análise destas sequências, através do programa "Blastn", revelou que elas apresentaram identidade com os peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD (TABELA 13), e, portanto, foram designadas 4181A, 4181B, 4181C e 4181D.

Embora os quatro peptídeos que compõem a aureocina A70 não sejam formilados (NETZ *et al.*, 2001), a presença de um grupamento formil (28 Da), em cada um dos peptídeos, 4181A, 4181B, 4181C e 4181D, explicaria o aumento de massa molecular encontrado.

A análise do terminal amino dos peptídeos 4181C e 4181D, também por espectrometria de massa, confirmou a presença do grupamento formil nestes peptídeos. Entretanto, não foi possível se confirmar, experimentalmente, a presença deste grupo no terminal amino dos peptídeos 4181A e 4181B.

Os resultados obtidos sugerem que os peptídeos de massa $2.951,7 \pm 1,5$ Da, $2.824 \pm 1,5$ Da, $2.981,7 \pm 1,5$ Da e $3.108,6 \pm 1,5$, designados 4181A, 4181B, 4181C e 4181D, correspondem aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD, acrescidos de um grupamento formil (TABELA 13).

A presença de outros componentes, de $3.147,8 \pm 1,5$ Da (peptídeo E) e $3.179,8 \pm 1,5$ Da (peptídeo F), nas frações purificadas, sugerem que a estirpe 4181 possa estar produzindo outra(s) bacteriocina(s), além da aureocina 4181. Mas nenhuma outra sequência de ácidos aminados foi determinada, inviabilizando a caracterização desses componentes.

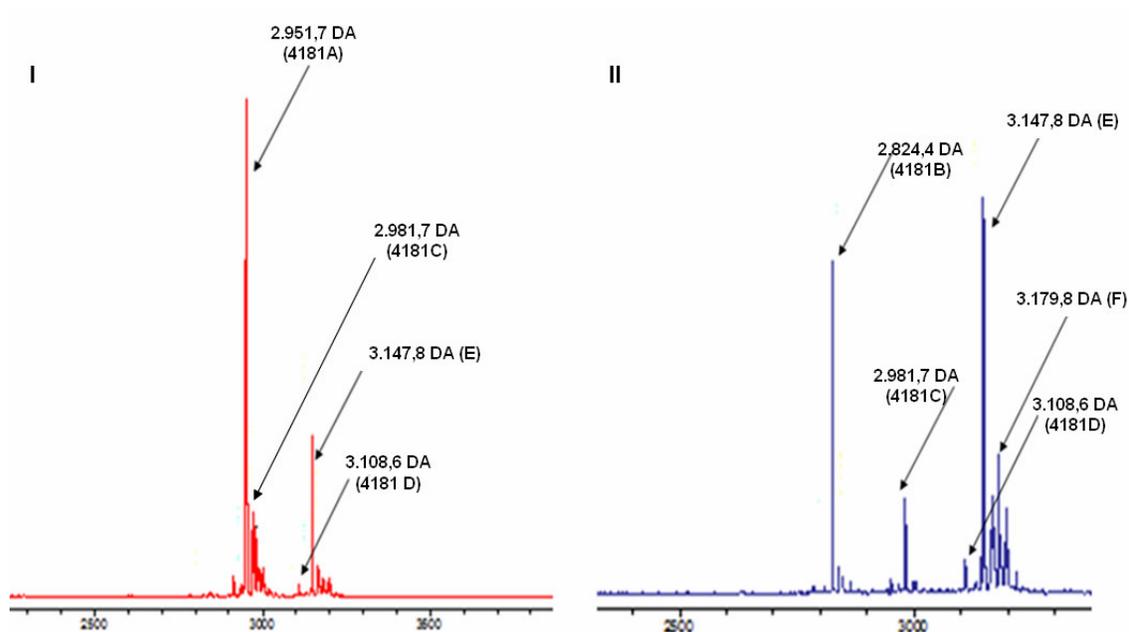


FIGURA 34: Análise da massa molecular da aureocina 4181. I, espectrometria de massa MALDI-TOF dos peptídeos presentes na fração 15; II, espectrometria de massa MALDI-TOF dos peptídeos presentes na fração 14, da HPLC na coluna “Sephasil Peptide C₈”.

TABELA 13: Peptídeos componentes das aureocinas 4181 e A70.

| Bacteriocina (Referência) | Peptídeo | Massa Molecular (Da) | Sequência de Ácidos Aminados (Número de Ácidos Aminados) |
|---|----------|----------------------|--|
| Aureocina 4181 (Este Trabalho) | 4181A | 2.951,7 ± 1,5 | IIGGGIASALGWAAGEK (17)* |
| | 4181B | 2.824,5 ± 1,5 | AALGGAAGGATYAGLKK (17)** |
| | 4181C | 2.981,7 ± 1,5 | IIGSGAAGGLGTYIGHK (17)** |
| | 4181D | 3.108,6 ± 1,5 | VIGWGAASGAGLYGLEK (17)** |
| Aureocina A70 (NETZ <i>et al.</i> , 2001) | AurA | 2.927, 3 ± 1,5 | MGKLAIKAGK <u>IIGGGIASALGWAAGEK</u> AVGK (31) |
| | AurB | 2.795,7 ± 1,5 | MGAVAKFLGKA <u>AALGGAAGGATYAGLKK</u> IFG (30) |
| | AurC | 2.954,8 ± 1,5 | MGALIKTGAK <u>IIGSGAAGGLGTYIGHK</u> ILGK (31) |
| | AurD | 3.087,7 ± 1,5 | MGAVIKVGAK <u>VIGWGAASGAGLYGLEK</u> ILKK (31) |

* Sequência parcial dos peptídeos eluídos na fração 15 da HPLC na coluna "Sephasil Peptide C₈".

** Sequência parcial dos peptídeos eluídos na fração 14 da HPLC na coluna "Sephasil Peptide C₈".

Sublinhado, região idêntica à aureocina 4181.

6. Sequenciamento do operon *aurABCD*

O operon *aurABCD* presente na estirpe *S. aureus* 4181 foi amplificado, por PCR, clonado no vetor pGEM-T Easy e transferido para *E. coli* DH5- α . Apenas um transformante, contendo o inserto desejado, foi obtido. O DNA plasmidial deste transformante foi isolado e o seu inserto foi sequenciado. Foram realizadas seis reações de sequenciamento com cada uma das fitas.

As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa "ClustalW2™" e a sequência-consenso gerada foi comparada com a sequência do operon *aurABCD* (codificado pelo plasmídeo pRJ6), também pelo programa "ClustalW2™". O alinhamento das sequências revelou que o operon *aurABCD* presente em ambos os plasmídeos, pRJ6 e pRJ80, é idêntico (FIGURA 35).

7. Comparação dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6

A análise da sequência do pRJ6 com o programa "NEBcutter V2.0" revelou que este plasmídeo apresenta um único sítio para as enzimas de restrição *Bgl*I e *Eco*RI, dois sítios para as enzimas *Eco*RV e *Pst*I, quatro sítios para as enzimas *Cl*I e *Hind*III (TABELA 14), dentre outros. Os produtos da digestão dos plasmídeos pRJ6 e pRJ80 com estas enzimas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O resumo dos resultados obtidos está apresentado na TABELA 14.

Embora o plasmídeo pRJ6 apresente quatro fragmentos gerados pela digestão com a enzima *Cl*I, de 230 pb, 1.136 pb, 2.718 pb e 3.820 pb, apenas três fragmentos (1.136 pb, 2.718 pb e 3.820 pb) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose. O quarto, e menor, fragmento não pôde ser visualizado (FIGURA 36). Todos os demais fragmentos esperados puderam ser observados (TABELA 14).

Foi possível se observar que, assim como o pRJ6, o plasmídeo pRJ80 apresentou um único fragmento após a digestão com a enzima *Eco*RI. Um único fragmento foi visualizado após a digestão do pRJ80 com a enzima *Hind*III, dois fragmentos foram visualizados após a sua digestão com *Bgl*I e três fragmentos foram visualizados após a sua digestão com *Eco*RV, *Cl*I e *Pst*I (TABELA 14).

As digestões dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6, com a enzima *Cl*I, geraram dois fragmentos de tamanho similar (*Cl*I-A, de aproximadamente 4 kb, e *Cl*I-B, com aproximadamente 3 kb), além de um terceiro fragmento, *Cl*I-C, de tamanhos distintos em cada um dos plasmídeos: aproximadamente 1,2 kb e 1,5 kb, no pRJ6 e no pRJ80, respectivamente (FIGURA 36).

Os produtos das digestões do plasmídeo pRJ80 foram transferidos para membranas de náilon, utilizadas para hibridações de DNA/DNA. Todos os fragmentos obtidos a partir da digestão do plasmídeo pRJ80 hibridaram com o plasmídeo pRJ6 marcado com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (FIGURA 37).

```

pRJ80      TACTCGAATGCTTAGTTATTTTTTAAAATTTTTTCTAAACCATATAAACCTGCGCCACT
pRJ6      TACTCGAATGCTTAGTTATTTTTTAAAATTTTTTCTAAACCATATAAACCTGCGCCACT
*****

pRJ80      AGCGGCTCCCCAACCAATGACCTTAGCACCTACTTTAATTACTGCGCCCATAGTTTCTC
pRJ6      AGCGGCTCCCCAACCAATGACCTTAGCACCTACTTTAATTACTGCGCCCATAGTTTCTC
*****
                ← aurD

pRJ80      TCCTTTGCTTTTTAAGTAAACGCTATTTACCTAGAATTTTATGACCAATATATGTACCTA
pRJ6      TCCTTTGCTTTTTAAGTAAACGCTATTTACCTAGAATTTTATGACCAATATATGTACCTA
*****

pRJ80      AACCACCAGCAGCACCCTACCAATGATTTTAGCACCAGTTTTAATTAATGCACCCATGT
pRJ6      AACCACCAGCAGCACCCTACCAATGATTTTAGCACCAGTTTTAATTAATGCACCCATGT
*****
                ← aurC

pRJ80      AAATAACTCCTTAAATTTTTTAAATATTAACCAAAAATCTTTTTTAACCTGCGTAAAGTT
pRJ6      AAATAACTCCTTAAATTTTTTAAATATTAACCAAAAATCTTTTTTAACCTGCGTAAAGTT
*****

pRJ80      GCGCCACCAGCAGCACCACCTAAAGCTGCTTTACCAAGAAATTTGCTACAGCACCCTATG
pRJ6      GCGCCACCAGCAGCACCACCTAAAGCTGCTTTACCAAGAAATTTGCTACAGCACCCTATG
*****
                ← aurB

pRJ80      AAAACACCTCCTCGAAAATTATTTATAGAATTATTTACCTACAGCTTCTCTCCAGCAGC
pRJ6      AAAACACCTCCTCGAAAATTATTTATAGAATTATTTACCTACAGCTTCTCTCCAGCAGC
*****

pRJ80      CCAACCAAGAGCGCTAGCGATACCACCGCCAATGATTTTTCCAGCTTTGATAGCTAATTT
pRJ6      CCAACCAAGAGCGCTAGCGATACCACCGCCAATGATTTTTCCAGCTTTGATAGCTAATTT
*****

pRJ80      CCCCATGTAACACCTCCCTTTTTTCTCTTGTTAATATTTATTATTAGTTGTTTTAAT
pRJ6      CCCCATGTAACACCTCCCTTTTTTCTCTTGTTAATATTTATTATTAGTTGTTTTAAT
*****
                ← aurA

```

FIGURA 35: Alinhamento das sequências da fita anticodificadora do operon *aurABCD* (sublinhado), presente nos plasmídeos pRJ80 e pRJ6, pelo programa "ClustalW2TM".

TABELA 14: Comparação de sítios de restrição encontrados nos plasmídeos pRJ80 e pRJ6.

| Enzima de Restrição | Número de Sítios de Restrição Identificados no pRJ6 | Tamanho (kb) dos Fragmentos Esperados após a Digestão do pRJ6 | Número de Fragmentos Observados após a Digestão do pRJ6 | Número de Fragmentos Observados após a Digestão do pRJ80 | Tamanho (kb) Aproximado dos Fragmentos Observados após a Digestão do pRJ80 |
|---------------------|---|---|---|--|--|
| <i>Bgl</i> I | 1 | 7,9 | 1 | 2 | 4,1 e 4,3 |
| <i>Cl</i> I | 4 | 0,2; 1,2; 2,7 e 3,8 | 3* | 3 | 1,5; 3,0 e 4,0 |
| <i>Eco</i> RI | 1 | 7,9 | 1 | 1 | 8,0 |
| <i>Eco</i> RV | 2 | 2,4 e 5,4 | 2 | 3 | 2,0; 2,1 e 4,3 |
| <i>Hind</i> III | 4 | 0,4; 1,1; 1,3 e 5,0 | 4 | 1 | 8,0 |
| <i>Pst</i> I | 2 | 1,7 e 6,1 | 2 | 3 | 2,3; 2,4 e 3,7 |

* Não foi possível se visualizar o quarto fragmento (230 pb) após eletroforese em gel de agarose.

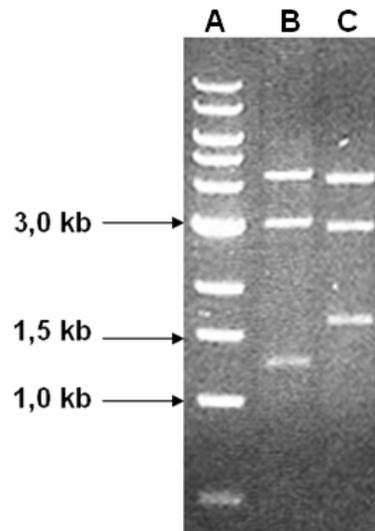


FIGURA 36: Digestão dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6 com a enzima *Cla*I. Gel de agarose a 0,7% (p/v) mostrando os plasmídeos pRJ80 e pRJ6 digeridos com a enzima *Cla*I, submetidos a uma corrida eletroforética por 1 h a 90 V. A, padrão “1-kb DNA ladder”; B, pRJ80 digerido com a enzima *Cla*I; e C, pRJ6 digerido com a enzima *Cla*I. Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

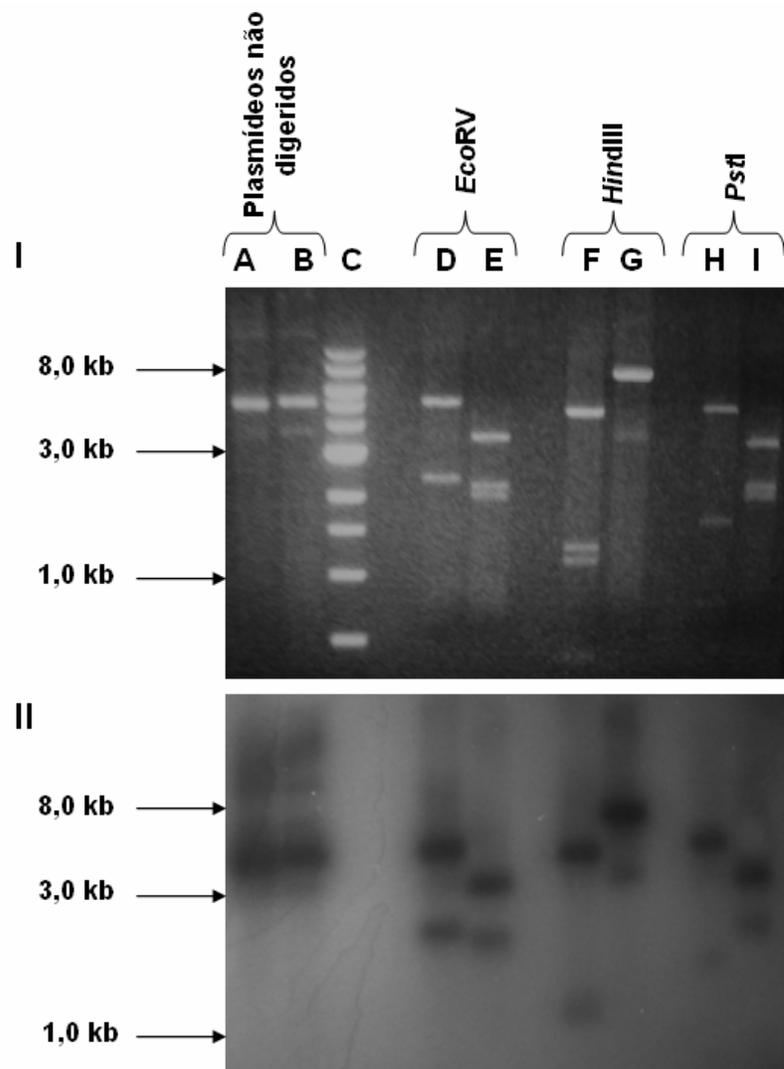


FIGURA 37: Comparação dos plasmídeos pRJ80 e pRJ6. I. Gel de agarose 0,7% (p/v) mostrando os plasmídeos pRJ6 e pRJ80 digeridos com as enzimas *EcoRV*, *HindIII* e *PstI*, submetidos a uma corrida eletroforética por 2 h a 60 V. II. Autorradiografia dos fragmentos de DNA hibridizados com o plasmídeo pRJ6 marcado com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. C, “1-kb DNA ladder”; A, D, F e H mostram o plasmídeo pRJ6; B, E, G e I mostram o plasmídeo pRJ80. Os números à esquerda do gel representam padrões de tamanho molecular.

DISCUSSÃO

A aureocina A70 é uma bacteriocina de classe II produzida pela estirpe *S. aureus* A70, isolada de leite comercial. Esta estafilococina é sensível à ação de enzimas proteolíticas, como tripsina e proteinase K, mas mantém sua atividade antimicrobiana, após tratamento a 75°C, por 1 h (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990).

A análise genética, a purificação da aureocina A70 e experimentos com peptídeos sintéticos demonstraram que a atividade antimicrobiana da aureocina A70 resulta da atividade sinérgica de quatro peptídeos catiônicos, não modificados, não processados e codificados pelo operon *aurABCD*. Embora esses peptídeos sejam individualmente ativos contra *M. luteus*, a ação inibitória aumenta drasticamente quando eles estão combinados. Contra *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp., a aureocina A70 só apresenta atividade antimicrobiana na presença dos quatro peptídeos (NETZ *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2009).

Os determinantes genéticos para a produção da aureocina A70 estão localizados em um plasmídeo de 7,9 kb, o pRJ6 (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990; NETZ *et al.*, 2001), que possui a habilidade de ser mobilizado por plasmídeos conjugativos de *Staphylococcus* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 1998b; COELHO *et al.*, 2009).

A aureocina A70 e suas variantes têm sido frequentemente isoladas entre estirpes de *Staphylococcus* spp. Bac⁺ de diferentes origens (BASTOS *et al.*, 2009), como leite comercial, pacientes e gado bovino, com mastite ou saudável (OLIVEIRA *et al.*, 1998c; GAMON *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2005; CEOTTO *et al.*, 2009). Provavelmente, a prevalência da aureocina A70 entre as estirpes de *Staphylococcus* spp. Bac⁺ se deve à transferência do pRJ6 para essas bactérias, através de mobilização (OLIVEIRA *et al.*, 1998b; COELHO *et al.*, 2009).

Dentre 257 estirpes de *Staphylococcus* spp., isoladas de diferentes casos de mastite em 56 rebanhos bovinos da região Sudeste do Brasil, 46 (17,9%) apresentaram produção de bacteriocinas sensíveis à ação de enzimas proteolíticas (CEOTTO *et al.*, 2009).

A análise de imunidade cruzada dessas bacteriocinas contra a estirpe *S. aureus* A70, a amplificação do operon *aurABCD* e a detecção deste mesmo operon por experimentos de hibridação DNA/DNA revelaram que 34 estirpes, dentre elas a estirpe 4181, produzem bacteriocinas semelhantes à aureocina A70 (CEOTTO *et al.*, 2009).

A ação da aureocina 4181 foi testada contra 40 estirpes de bactérias Gram-positivas, inibindo 13 indicadoras diferentes, dentre elas estirpes de *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas e de SCN, envolvidas em infecções humanas, sugerindo que esta bacteriocina apresenta um potencial de aplicação biotecnológica na prevenção e no controle de infecções estafilocócicas (CEOTTO, 2005).

Esta bacteriocina também foi capaz de inibir *L. monocytogenes*, um importante patógeno associado a alimentos e mastite bovina (CARRASCO *et al.*, 2009; CORDANO & JACQUET, 2009; PINTADO *et al.*, 2009).

A ação de diferentes estafilococcinas (aureocinas A70 e A53, 215FN, Pep5, epilancina K7, epicidina 280 e epidermina) foi testada contra estirpes clínicas de *Staphylococcus* spp. multirresistentes a drogas. A aureocina A53 e a epidermina se destacaram por apresentar ação contra estirpes de MRSA, enquanto a Pep5 se destacou por apresentar atividade antagonística tanto contra MRSA como contra SCN. As demais bacteriocinas não inibiram a maioria das estirpes de *Staphylococcus* spp. testadas, sugerindo que estas estafilococcinas não apresentam potencial de aplicação no combate a infecções estafilocócicas, inclusive a aureocina A70, que inibiu menos de 10% das estirpes testadas (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Dentre as estirpes sensíveis à ação da aureocina 4181, estavam as estirpes *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118, isoladas de infecções nosocomiais, que se mostraram resistentes à ação da aureocina A70 (CEOTTO, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2006). Esta diferença no espectro de ação das aureocinas 4181 e A70 sugeria que estas bacteriocinas poderiam apresentar diferenças importantes nas suas atividades antimicrobianas.

A fim de se confirmar a diferença de espectro de ação entre as aureocinas 4181 e A70, novos testes contra estirpes clínicas de *Staphylococcus* spp. foram realizados. Os testes feitos em placas de microdiluição mostraram-se mais sensíveis do que os testes realizados em meio sólido, uma vez que foi possível se detectar atividade antagonística da aureocina A70 contra as estirpes *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118.

Apesar da aureocina A70 ter inibido as estirpes clínicas de *Staphylococcus* spp. nos testes realizados em placas de microdiluição, a aureocina 4181 apresentou atividade mais eficaz contra as estirpes indicadoras. A estirpe *S. aureus* 4 mostrou-se quatro vezes mais sensível e a estirpe *S. epidermidis* 118 mostrou-se duas vezes mais sensível à aureocina 4181 do que à ação da aureocina A70. A maior sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus* spp. à aureocina 4181 sugere que talvez haja uma diferença no modo de ação destes peptídeos, uma vez que as mesmas quantidades de bacteriocina (1.024 UB) foram empregadas em ambos os testes.

A cinética da produção da aureocina 4181 foi determinada nos meios BHI e GM17 visando-se otimizar a sua purificação. Após 8 h, no final da fase log de crescimento bacteriano, pôde-se detectar a produção máxima desta bacteriocina em ambos os meios, embora esta fosse maior em GM17.

Outras estirpes de *Staphylococcus* spp. Bac⁺, também apresentam máxima produção de estafilococcinas no final da fase log do seu crescimento (NASCIMENTO *et al.*, 2004), inclusive as estirpes *S. simulans* 3299 e *S. aureus* 4185, isoladas de mastite bovina.

Após 24 h de crescimento, houve uma redução da atividade de bacteriocina presente no sobrenadante da estirpe 4181 em ambos os meios de cultura. A aureocina 4181, assim como a aureocina A70, é sensível à ação de proteases (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1990; CEOTTO, 2005). Provavelmente, a redução observada na quantidade desta bacteriocina está relacionada com a degradação da aureocina 4181 por proteases secretadas no sobrenadante da cultura. Este comportamento também é observado em relação à aureocina A70 (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

A determinação da cinética de atividade das aureocinas 4181 e A70 contra a estirpe *M. luteus* ATCC 4698 foi realizada. Pôde-se inferir que as aureocinas 4181 e A70 apresentam mecanismos de ação diferentes, uma vez que a aureocina 4181 foi capaz de lisar completamente a bactéria indicadora, mas a aureocina A70 causou apenas lise parcial da estirpe. A aureocina 4181 apresentou atividade bacteriolítica, a se julgar pela drástica redução da DO₆₀₀ da cultura da estirpe indicadora. A lise parcial das células de *M. luteus*, pela aureocina A70, sugere que esta bacteriocina apresenta atividade bactericida, mas não acentuadamente bacteriolítica.

Em conjunto, as bacteriocinas produzidas pela estirpe 4185 apresentam atividade bacteriolítica semelhante à ação da aureocina 4181. Alguns lantibióticos, como a nisina, podem apresentar modo de ação bacteriolítico, relacionado à inibição da biossíntese da parede celular e à formação de poros na membrana celular (BIERBAUM & SAHL, 2009).

A aureocina A53 também apresenta atividade bacteriolítica. Este peptídeo é capaz de permeabilizar a membrana das células sensíveis e a sua atividade antibacteriana pôde ser observada em poucos minutos (NETZ, BASTOS & SAHL, 2002).

A ação da simulancina 3299 também ocasionou apenas lise parcial de *M. luteus*, sugerindo que este lantibiótico apresenta atividade bactericida, mas não extremamente bacteriolítica, assim como a aureocina A70.

Bacteriocinas bactericidas, mas não bacteriolíticas, têm sido descritas na literatura. Em geral, as bacteriocinas da subclasse IIIb promovem a dissipação da força próton-motora, levando ao extravasamento de ATP e morte celular, sem causar lise da célula-alvo (HENG *et al.*, 2007).

A maior atividade bacteriolítica da aureocina 4181 poderia explicar a maior sensibilidade dos estafilococos a esta bacteriocina, quando comparada à sensibilidade à aureocina A70.

A aureocina 4181 mostrou-se hidrofóbica e catiônica como a maioria das bacteriocinas (BASTOS *et al.*, 2009), tendo sido purificada através da precipitação do sobrenadante da cultura da estirpe 4181 com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e duas corridas de HPLC. As frações 14 e 15, eluídas com cerca de 65% de isopropanol na segunda corrida de HPLC, apresentaram maior atividade antimicrobiana e

foram utilizadas para a determinação da sua massa molecular e para o sequenciamento dos seus ácidos aminados.

Nenhum dos componentes detectados por espectrometria de massa MALDI-TOF apresentou massa molecular idêntica aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD, que compõem a aureocina A70, produzida pela estirpe *S. aureus* A70 (NETZ *et al.*, 2001). Entretanto, o sequenciamento dos ácidos aminados desses componentes revelou quatro seqüências parciais que são idênticas aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD (TABELA 11) e que, portanto, foram designadas 4181A, 4181B, 4181C e 4181D.

Adicionalmente, o sequenciamento de DNA revelou que o operon *aurABCD*, encontrado no plasmídeo pRJ80, é idêntico ao encontrado no pRJ6. Logo, pôde-se concluir que a estrutura primária dos peptídeos 4181A, 4181B, 4181C e 4181D, sintetizados pela estirpe 4181, é idêntica à estrutura primária dos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD, sintetizados pela estirpe A70.

Os peptídeos encontrados apresentaram um aumento na massa molecular entre 21 e 28 Da, em relação aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD. A presença de um grupamento formil (28 Da), em cada um dos peptídeos, 4181A, 4181B, 4181C e 4181D, explicaria a diferença de massa molecular encontrada.

A análise do terminal amino dos peptídeos 4181C e 4181D, também por espectrometria de massa, confirmou a presença do grupamento formil nestes peptídeos, ou seja, a diferença de massa encontrada entre os peptídeos 4181C e AurC, e 4181D e AurD, se deve realmente à presença de um radical formil no terminal amino dos peptídeos produzidos pela estirpe 4181.

A estrutura primária dos peptídeos 4181A e 4181B é idêntica à estrutura primária dos peptídeos AurA e AurB. A diferença de massa molecular encontrada (24 a 28 Da) corresponde à massa de um grupamento formil. Adicionalmente, este radical está presente no terminal amino de 4181C e de 4181D. Estes dados sugerem que os peptídeos 4181A e 4181B também apresentam um grupamento formil no seu terminal amino, embora não tenha sido possível se confirmar isto, experimentalmente.

Sendo assim, pôde-se concluir que os peptídeos de massa $2.951,7 \pm 1,5$ Da, $2.824 \pm 1,5$ Da, $2.983,7 \pm 1,5$ Da e $3.108,6 \pm 1,5$, designados 4181A, 4181B, 4181C e 4181D, correspondem aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD, acrescidos de um grupamento formil (TABELA 13). A presença deste grupamento formil no terminal amino dos quatro peptídeos que compõem a aureocina 4181 foi a única diferença encontrada entre as aureocinas 4181 e A70. Assim como a aureocina A70, a aureocina 4181, pertence à subclasse IIe proposta neste trabalho.

A presença de dois peptídeos, de $3.147,8 \pm 1,5$ Da e $3.179,8 \pm 1,5$ Da, nas frações purificadas sugere que a estirpe 4181 talvez possa estar produzindo outras bacteriocinas, ou uma outra bactericina de dois componentes, além da aureocina 4181. Mas como nenhuma

sequência de ácidos aminados foi determinada para estes peptídeos, não foi possível caracterizá-los. Portanto, a diferença de espectro e do modo de ação entre as aureocinas 4181 e A70 pode estar relacionada a dois fatores distintos: a produção de outra(s) bacteriocina(s) pela estirpe 4181, ou à presença do radical formil na aureocina 4181.

Nenhuma correlação entre a presença de um radical formil no terminal amino de um peptídeo e a sua atividade antimicrobiana foi descrita até o momento. Entretanto, as bacteriocinas de classe II se ligam à membrana das células-alvo através de interações eletrostáticas com o seu terminal amino (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009). Modificações neste terminal poderiam, portanto, implicar na alteração entre as interações peptídeo-membrana e, conseqüentemente, no seu mecanismo de atividade.

A aureocina A53 é um exemplo de bacteriocina (subclasse IIc) que age permeabilizando a membrana das células sensíveis. Este peptídeo, de $6.012,5 \pm 0,5$ Da, é composto por 51 ácidos aminados e também apresenta um grupamento formil no seu terminal amino. A aureocina A53 possui um amplo espectro de ação contra bactérias do gênero *Staphylococcus*, marcadamente mais expressivo do que o das demais estafilococcinas descritas na literatura, até o presente momento (NETZ, BASTOS & SAHL, 2002; NETZ *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2007).

Como já mencionado anteriormente, a lacticina Q, uma variante da aureocina A53, também apresenta ação bacteriolítica contra bactérias Gram-positivas, age em concentrações nanomolares e se liga inespecificamente à membrana das células-alvo. Assim como a aureocina A53, a lacticina Q apresenta um grupamento formil no seu terminal amino (YONEYAMA *et al.*, 2009a).

Será necessária a realização de experimentos complementares para se identificar se a diferença de espectro e do modo de ação entre a aureocina A70 e a aureocina 4181 se deve à presença do radical formil, ou se a estirpe 4181 produz alguma outra bacteriocina responsável pela inibição das estirpes de *Staphylococcus* spp. e pela acentuada lise de *M. luteus* ATCC 4698. Em havendo a produção de pelo menos mais uma bacteriocina, os resultados obtidos sugerem a ocorrência de sinergismo entre elas.

Enquanto o plasmídeo pRJ6, que codifica a aureocina A70, possui 7,9 kb (COELHO *et al.*, 2009), o plasmídeo pRJ80, que codifica a aureocina 4181, possui aproximadamente 8,5 kb (CEOTTO, 2005). Estes dois plasmídeos apresentam diferentes perfis quando digeridos com as enzimas *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RV, *Hind*III e *Pst*I, sugerindo, portanto, que seus mapas de restrição são distintos. Contudo, todos os fragmentos obtidos a partir da digestão do plasmídeo pRJ80 hibridizaram com o plasmídeo pRJ6 marcado com α^{32} P-dCTP. Sendo assim, pôde-se concluir que o pRJ80 é um plasmídeo relacionado, mas não idêntico, ao pRJ6.

CONCLUSÕES

- ✓ Através dos testes realizados em placas de microdiluição, foi possível se detectar a atividade antagonística da aureocina A70 contra *Staphylococcus* spp. isolados de infecções nosocomiais.
- ✓ Os testes de atividade de bacteriocina realizados em placas de microdiluição foram mais sensíveis do que os testes realizados em meio sólido.
- ✓ As estirpes *S. aureus* 4 e *S. epidermidis* 118, isoladas de infecções nosocomiais, mostraram-se mais sensíveis à ação da(s) aureocina(s) 4181, do que à ação da aureocina A70.
- ✓ As aureocinas 4181 e A70 apresentam mecanismos de ação distintos: *M. luteus* ATCC 4698 sofreu lise total pela ação da(s) aureocina(s) 4181, mas sofreu apenas lise parcial pela ação da aureocina A70.
- ✓ A produção da(s) aureocina(s) 4181 é maior quando a estirpe 4181 é cultivada em meio GM17, do que quando a estirpe 4181 é cultivada em BHI e, no final da fase log de crescimento, pôde-se detectar a máxima produção da(s) aureocina(s) 4181.
- ✓ A(s) aureocina(s) 4181 pôde (puderam) ser purificada(s) a partir do sobrenadante da cultura da estirpe *S. aureus* 4181, através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e duas corridas de HPLC.
- ✓ Os peptídeos de massa $2.951,7 \pm 1,5$ Da, $2.824 \pm 1,5$ Da, $2.983,7 \pm 1,5$ Da e $3.108,6 \pm 1,5$ Da (4181A, 4181B, 4181C e 4181D) parecem corresponder aos peptídeos AurA, AurB, AurC e AurD, acrescidos de um grupamento formil.
- ✓ Dois componentes, de $3.147,8 \pm 1,5$ Da e $3.179,8 \pm 1,5$ Da, purificados juntos com a aureocina 4181 podem ser outra(s) bacteriocina(s) produzida(s) pela estirpe *S. aureus* 4181.
- ✓ Diferenças encontradas no espectro e no mecanismo de ação das aureocinas A70 e 4181 podem estar relacionadas a dois fatores diferentes: à presença do grupamento formil na aureocina 4181 ou à produção de outra(s) bacteriocina(s) pela estirpe 4181.
- ✓ O plasmídeo pRJ80 é relacionado, mas não idêntico, ao pRJ6.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de se determinar se a diferença de espectro e do modo de ação encontrados se deve à presença de radical formil na aureocina 4181, ou à produção de outra(s) bacteriocina(s) pela estirpe 4181, serão realizados os seguintes experimentos:

- ✓ cura do plasmídeo pRJ80 da estirpe 4181 e teste de produção de bacteriocina.

Caso haja perda completa da atividade antimicrobiana pela estirpe *S. aureus* 4181 (curada do plasmídeo pRJ80), serão realizadas as seguintes etapas:

- ✓ transferência do plasmídeo pRJ6 (marcado com o elemento Tn917-*lac*) para a estirpe 4181 Bac⁻ (curada do pRJ80);
- ✓ comparação do espectro de ação da bacteriocina produzida pelo transformante contendo o pRJ6::Tn917-*lac* e
- ✓ purificação e determinação da massa molecular da aureocina A70 produzida pela estirpe transformada.

Se a estirpe 4181 curada do pRJ80 continuar produzindo bacteriocina(s), serão realizadas as seguinte etapas:

- ✓ determinação da cinética de produção e de atividade ;
- ✓ determinação do espectro de ação;
- ✓ purificação e
- ✓ caracterização molecular desta(s) nova(s) bacteriocina(s).

A bacteriocina responsável pela atividade antagonística contra *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme será testada contra o biofilme formado por estas bactérias.

BIBLIOGRAFIA

ALLGAIER, H.; JUNG, G.; WERNER, R.G.; SCHNEIDER, U. & ZÄHENER, H. **Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic.** Eur. J. Biochem., 160, 9-22, 1986.

AMYES, S.G. **Enterococci and streptococci.** Int. J. Antimicrob. Agents, 3, S43-S52, 2007.

ARRIZUBIETA, M.J.; TOLEDO-ARANA, A.; AMORENA, B.; PENADÉS, J.R. & LASA, I. **Calcium inhibits Bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 86(22), 7490-7498, 2004.

ASADUZZAMAN, S.M.; NAGAO, J.; ASO, Y.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1.** Appl. Environ. Microbiol., 72(9), 6012-6017, 2006.

ASO, Y.; NAGAO, J.; KOGA, H.; OKUDA, K.; KANEMASA, Y.; SASHIHARA, T.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Heterologous expression and functional analysis of the gene cluster for the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1.** J. Biosci. Bioeng., 98(6), 429-436, 2004a.

ASO, Y.; SASHIHARA, T.; NAGAO, J.; KANEMASA, Y.; KOGA, H.; HASHIMOTO, T.; HIGUCHI, T.; ADACHI, A.; NOMIYAMA, H.; ISHIZAKI, A.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Characterization of a gene cluster of *Staphylococcus warneri* ISK-1 encoding the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 68(8), 1663-1671, 2004b.

ASO, Y.; KOGA, H.; SASHIHARA, T.; NAGAO, J.; KANEMASA, Y.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Description of complete DNA sequence of two plasmids from the nukacin ISK-1 producer, *Staphylococcus warneri* ISK-1.** Plasmid, 53(2), 164-178, 2005a.

ASO, Y.; OKUDA, K.; NAGAO, J.; KANEMASA, Y.; THI, N.B.P.; KOGA, H.; SHIOYA, K.; SASHIHARA, T.; NAKAYAMA, J. & SOMOMOTO, K. **A novel type of immunity protein, NukH, for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(7), 1403-1410, 2005b.

ATKINSON, W.; HAMBORSKY, J.; MCINTYRE, L. & WOLFE, S. **Diphtheria.** In: Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases, 59–70. Edited by Public Health Foundation, Washington DC, 2007.

AUGUSTIN, J.; ROSESTEIN, R.; WIELAND, B.; SCHNEIDER, U.; SCHNELL, N.; ENGELKE, G.; ENTIAN, K.D. & GÖTZ, F. **Genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin negative mutants of *Staphylococcus epidermidis***. Eur. J. Biochem., 204, 1149-1154, 1992.

BANNERMAN, J.Y. & PEACOCK, S.J. ***Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci***, 390-411. In: Manual of Clinical Microbiology. Edited by MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C. & YOLKEN, R.H, ASM Press., Washington DC, 2007.

BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. **The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis**. J. Dairy Sci., 89, 1877-1895, 2006.

BASTOS, M.C.F.; CEOTTO, H.; COELHO, M.L.V.; NASCIMENTO, J.S. **Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications**. Curr. Pharm. Biotechnol., 10, 38-61, 2009.

BATUR, C.A.; OZBAL, A.E.; BASAK, T. & TURGUT, S. **Laryngeal actinomycosis accompanying laryngeal carcinoma: report of two cases**. Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 263(8), 783-785, 2006.

BAYLES, K.W.; WESSON, C.A.; LIU, L.E.; FOX, L.K.; BOHACH, G.A. & TRUMBLE, W.R. **Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells**. Infect. Immun., 66, 336-342, 1998.

BIERBAUM, G.; GÖTZ, F.; PESCHEL, A.; KUPKE, T.; VAN DE KAMP, M. & SAHL, H.-G. **The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7**. Antonie van Leeuwenhoek, 69, 119-127, 1996.

BIERBAUM, G. & SAHL, H.-G. **Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering**. Curr. Pharm. Biotechnol., 10, 2-18, 2009.

BOURRY, A.; COCHARD, T. & POUTREL, B. **Serological diagnosis of bovine, caprine and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay**. J. Clin. Microbiol., 35, 1606-1608, 1997.

BOYCE, J.M. **Preventing staphylococcal infections by eradicating nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: proceeding with caution.** Infect. Control Hosp. Epidemiol., 17(12), 775-779, 1996.

BREDE, D.A.; FAYE, T.; JOHNSBORG, O.; ØDEGÅRD, I.; NES, I.F. & HOLO, H. **Molecular and genetic characterization of propionin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*.** Appl. Environ. Microbiol., 70 (12), 7303-7310, 2004.

BRITO, J. R. F. & BRITO, M. A. V. P. **Mastite Bovina.** In: Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Ministério da Agricultura, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. ISBN 85-85748-26-5, 2000.

BRITO, M.A.V.P. **Resíduos de antimicrobianos no leite.** Ministério da Agricultura, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. ISSN 1517-4816, 2000.

CALL, D.R.; DAVIS, M.A. & SAWANT, A.A. **Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production.** Anim. Health Res. Rev. 9(2), 159–167, 2008.

CAMPBELL, E.A., WESTBLADE, L.F. & DARST, S.A. **Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective.** Curr. Opin. Microbiol., 11(2),121-127, 2008.

CARNEIRO, A.V.; STOCK, L.A.; OLIVEIRA, V.M.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G.R.; MARTINS, P.C. & YAMAGUCHI, L.C.T. **Mastite clínica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro.** Anais do XX Congresso Latinoamericano de Produção Animal, 2007.

CARRASCO, E.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A.; GARCÍA-GIMENO, R.M. & ZURERA, G. **Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis.** J. Food Prot., 70(10), 2407-2412, 2007.

CARVALHO, A.O & GOMES, V.M. **Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties.** Peptides, 30(5), 1007-1020, 2009.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S.K.; DUCHÉ, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBÈS, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S. & CAVARD, D. **Colicin biology.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1(1), 158-229, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Pelvic inflammatory diseases.** Morb. Mortal. Wkly. Rep., 56(14), 332-336, 2007.

CEOTTO, H. **Caracterização de estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de bacteriocinas envolvidas em mastite bovina na Região Sudeste do Brasil.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ), 97 p., 2005.

CEOTTO, H.; NASCIMENTO, J.S.; BRITO, M.A.P. & BASTOS, M.C.F. **Bacteriocin production by *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis in Brazil.** Res. Microbiol., *in press*, 2009.

CERIKCIOGLU, N. & BEKSAC, M.S. **Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis.** Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 12(1), 13-16, 2004.

CHAMBERS, H.F. **Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.** Clin. Microbiol. Rev., 10, 781-791, 1997.

CHAN, Y.C. & WIEDMANN, M. **Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 49(3), 237-253, 2009.

CHUMCHALOVA, J. & SMARDA, J. **Human tumor cells are selectively inhibited by colicins.** Folia Microbiol. (Praha), 48(1), 111-115, 2003.

CLIMO, M.W.; PATRON, R.L.; GOLDSTEIN, B.P. & ARCHER, G.L. **Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis.** Antimicrob. Agents Chemother., 42(6), 1355-1360, 1998.

COCCHIARO, J.L.; GOMEZ, M.I.; RISLEY, A.; SOLINGA, R.; SORDELLI, D.O. & LEE, J.C. **Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*.** Mol. Microbiol., 59(3), 948-960, 2006.

COELHO, M.L.V.; NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, P.C.; MADUREIRA, D.J.; OLIVEIRA, S.S.; BRITO, M.A.V.P. & BASTOS, M.C.F. **Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis.** Res. Microbiol., 158, 625-630, 2007.

COELHO, M.L.V.; GEOTTO, H.; MADUREIRA, D.J.; NES, I.F. & BASTOS, M.C.F. **Mobilization functions of the bacteriocinogenic plasmid pRJ6 of *Staphylococcus aureus***. J. Microbiol. 47(3), 327-336, 2009.

CORDANO, A.M. & JACQUET, C. ***Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization**. Int. J. Food Microbiol., 132(2-3), 176-179, 2009.

CORRIGAN, R.M.; RIGBY, D.; HANDLEY, P. & FOSTER, T.J. **The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation**. Microbiology, 153(8), 2435-2446, 2007.

COTTER, P.D.; HILL, C. & ROSS, R.P. **Bacteriocins: developing innate immunity for food**. Nat. Rev. Microbiol., 3, 777-788, 2005.

COTTER, P.D.; O'CONNOR, P.M; DRAPER, L.A.; LAWTON, E.M.; DEEGAN, L.H.; HILL, C. & ROSS, P.R. **Posttranslational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147**. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 102(51), 18584-18589, 2005.

CRAMTON, S.E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F. & DÖRING, G. **Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis***. Infect. Immun., 69, 4079-4085, 2001.

CRUPPER, S.S. & IANDOLO J.J. **Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI182**. Appl. Environ. Microbiol., 62: 3171-3175, 1996.

CRUPPER, S.S.; GIES, A.J. & IANDOLO J.J. **Purification and characterization of staphylococin BacR1, a broad-spectrum bacteriocin**. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4185-4190, 1997.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I. & PENADÉS, J.R. **Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation**. J. Bacteriol., 183 (9), 2888-2896, 2001.

DAESHEL, M.A. **Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to LAB bacteriocins.** In: Bacteriocins of lactic acid bacteria, 66-69. Edited by Hoover, D.G. & Steenson, L.R. Academic Press, San Diego, California, USA, 1993.

DAJANI, A.S. & WANNAMAKER, L.W. **Demonstration of a bactericidal substance against beta-hemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures.** J Bacteriol., 97(3), 985-991, 1969.

DANCER, S.J. **The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J. Antimicrob. Chemother., 61(2), 246-253, 2008.

DIB, J.; MOTOK, J.; ZENOFF, V.F.; ORDOÑEZ, O. & FARÍAS, M.E. **Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4400 m) Andean wetlands.** Curr. Microbiol., 56(5), 510-517, 2008.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M. & SCHLIEVERT, P.M. **Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.** Clin. Microbiol. Rev., 13 (1), 16-34, 2000.

DUFOUR, A.; HINDRÉ, T.; HARAS, D. & LE PENNEC, J.P. **The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age.** FEMS Microbiol. Rev., 31(2), 134-167. 2007.

EKKELENKAMP, M.B.; HANSEN, M.; DANNY HSU, S.T.; DE JONG, A.; MILATOVIC, D.; VERHOEF, J. & VAN NULAND, N.A. **Isolation and structural characterization of epilancin 15X, a novel lantibiotic from a clinical strain of *Staphylococcus epidermidis*.** FEBS Lett., 579 (9), 1917-1922, 2005.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SANOMOKO, K. & ISHIZAKI, A. **Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity.** FEMS Microbiol. Rev., 24, 85-106, 2000.

ERSFELD-DRESSEN, H.; SAHL, H.-G. & BRANDIS, H. **Plasmid involvement in production of an immunity to the staphylococcin-like peptide Pep5.** J. Gen. Microbiol., 130, 3029-3035, 1984.

EUZÉBY, J.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature.** <http://www.bacterio.citct.fr>, 2009.

FLEURY, Y.; DAYEM, M.A.; MONTAGN, J.J.; CHABOISSEAU, E.; LE CAER, J.P.; NICOLAS, P. & DELFOUR, A. **Covalent structure, synthesis and structure-function studies of mesentericin Y105, a defensin peptide from a gram-positive bacteria, *Leuconostoc mesenteroides***. J. Biol. Chem., 271, 14421-14429, 1996.

FONTANA, M.B.; BASTOS M.C.F. & BRANDELLI, A. **Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters**. Curr. Microbiol., 52(5), 350-353, 2006.

FONTANA, M.B.; BASTOS, M.C.F. & BRANDELLI, A. **Peptide-like substances as antimicrobial barriers to *Corynebacterium* spp. adhesion to silicone catheters**. Lett. Appl. Microbiol., 45, 324-329, 2007.

FUJITA, K.; ICHIMASA, S.; ZENDO, T.; KOGA, S.; YONEYAMA, F.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria**. Appl. Environ. Microbiol., 73(9), 2871-2877, 2007.

FURMANEK, B.; KACZOROWSKI, T.; BUGALSKI, R.; BIELAWSKI, K.; BOHDANOWICZ, J. & PODHAJSKA, A.J. **Identification, characterization and purification of the lantibiotic staphylococcin T, a natural gallidermin variant**. J. Appl. Microbiol., 87(6), 856-866, 1999.

GÁLVEZ, A.; ABRIOEL, H.; LÓPEZ, R.L. & OMAR, N.B. **Bacteriocin-based strategies for food biopreservation**. Int. J. Food. Microbiol., 120, 51-70, 2007.

GAMON, M.R.; MOREIRA, E.C.; OLIVEIRA, S.S.; TEIXEIRA, L.M. & BASTOS, M.C.F. **Characterization of a novel bacteriocin-encoding plasmid found in clinical isolates of *Staphylococcus aureus***. Antonie van Leeuwenhoek, 75, 233-243, 1999.

GAUCHERON, F. **The minerals of milk**. Reprod. Nutr. Dev., 45(4), 473-483, 2005.

GENOSCOPE, Genoscope - Centre National de Séquençage. ***Streptococcus salivarius***. Genome Project. <http://www.genoscope.cns.fr>, 2008.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; MAFRA, M.A.; PENIDO, E.G.C. & BASTOS, M.C.F. **Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus***. J. Gen. Microbiol., 136, 1591-1599, 1990.

GORDON, D.M.; OLIVER, E. & LITTLEFIELD-WYER, J. **The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria**. In: Bacteriocins: ecology and evolution, 5-44. Edited by Riley, M.A. & Chavan, M.A., Springer, New York, 2007.

GOTOH, I. & NISHIDA, E. **Signal transductions by the MAP kinase cascades**. Nippon. Rinsho., 56(7), 1779-1783, 1998.

GÖTZ, F. **Staphylococcus and biofilms**. Mol. Microbiol., 43 (6), 1367-1378, 2002.

GU, J.; LI, H.; LI, M.; VUONG, C.; OTTO, M.; WEN, Y. & GAO, Q. **Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis***. J. Hosp. Infect., 61, 342-348, 2005.

GUO, B.; ZHAO, X.; SHI, Y.; ZHU, D. & ZHANG, Y. **Pathogenic implication of a fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* in a rat model of intravascular-catheter-associated infection**. Infect. Immun., 75(6), 2991-2995, 2007.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R. & DECOSTERE, A. **Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?** Vet. Microbiol., 100(3-4), 255-268, 2004.

HASTINGS, J.W.; SAILER, M.; JOHNSON, K.; ROY, K.L.; VESERAS, J.C. & STILES, M.E. **Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum***. J. Bacteriol., 173, 7491-7500, 1991.

HAVARSTEIN, L.S.; DIEP, D.B. & NES, I.F. **A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export**. Mol. Microbiol., 16, 229-240, 1995.

HÉCHARD, Y.; FERRAZ, S.; BRUNETEAU, E.; STEINERT, M. & BERJEAUD, J.M. **Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide**. Microbiol. Lett., 252, 19-23, 2005.

HEIDRICH, C.; PAG, U.; JOSTEN, M.; METZGER, J.; JACK, R.W.; BIERBAUM, G.; JUNG, G. & SAHL H.-G. **Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster**. Appl. Environ. Microbiol., 64, 3140-3146, 1998.

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G. & GÖTZ, F. **Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface.** Mol. Microbiol., 24, 1013-1024, 1997.

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W. & TAGG, J.R. **The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria.** In: Bacteriocins: ecology and evolution, 45-92. Edited by Riley, M.A. & Chavan, M.A., Springer, New York, 2007.

HERRANZ, C.; CHEN, Y.; CHUNG, H.J.; CINTAS, C.N.; HERNÁNDEZ, P.E.; MONTEVILLE, T.J. & CHIKINDAS, M.L. **Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *E. faecium* T136.** Appl. Environ. Microbiol., 67(4), 689-1692, 2001.

HILLE, M.; KIES, S.; GÖTZ, F. & PESCHEL, A. **Dual role of GdmH in producer immunity and secretion of the staphylococcal lantibiotics gallidermin and epidermin.** Appl. Environ. Microbiol., 67, 1380-1383, 2001.

HILLERTON, J.E. & BERRY, E.A. **Treating mastitis in the cow - a tradition or an archaism.** J. Appl. Microbiol., 98(6), 1250-1255, 2005.

HOFFMANN, A.; SCHNEIDER, T.; PAG, U. & SAHL, H.-G. **Localization and functional analysis of Pepl, the immunity peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5.** Appl. Environ. Microbiol., 70(6), 3263–3271, 2004.

HOFFMASTER, A.R.; HILL, K.K.; GEE, J.E.; MARSTON, C.K.; DE, B.K.; POPOVIC, T.; SUE, D.; WILKINS, P.P.; AVASHIA, S.B.; DRUMGOOLE, R.; HELMA, C.H.; TICKNOR, L.O.; OKINAKA, R.T. & JACKSON, P.J. **Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes.** J. Clin. Microbiol., 44, 3352-3360, 2006.

HUSSAIN, M.; HERMANN, M.; VON EIFF, C.; PERDREAU-REMGTON, F. & PETERS, G. **A 140-kilodalton-extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces.** Infect. Immun., 65, 519-524, 1997.

ISHIZAKI, A.; TAKESE, E.; IKAI, T.; KUMAI, S.; NAGANO, R.; SONOMOTO, K.; DOI, K.; OGATA, S.; KAWAMURA, Y. & EZAKI, T. **Taxonomic position of new bacteriocin (nukacin ISK-1) producer isolated from long-aged nukadoko.** J. Gen. Appl. Microbiol., 47(3), 143-147, 2001.

IWATANI, S.; ZENDO, T.; YONEYAMA, F.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 71(8), 1984-1992, 2007.

JABRANE, A.; SABRI, A.; COMPERE, P.; JACQUES, P.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. & THONART, P. **Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen.** Appl. Environ. Microbiol., 68(11), 5704-5710, 2002.

JACK, R. W.; TAGG, J. R. & RAY, B. **Bacteriocins of Gram-positive bacteria.** Microbiol. Rev., 59, 171-200, 1995.

JENSSEN, H.; HAMILL, P. & HANCOCK, R.E.W. **Peptide Antimicrobial Agents.** Clin. Microbiol. Rev., 19, 491-511, 2006.

JETTEN, A.M.; VOGELS, G.D. & WINDT, F. **Nature and properties of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin.** J. Bacteriol., 59, 171-200, 1972.

KALETTA, C.; ENTIAN, K.D.; KELLNER, R.; JUNG, G.; REIS, M. & SAHL, H.-G. **Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence.** Arch. Microbiol., 152(1), 16-19, 1989.

KIMURA, H.; NAGANO, R.; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. **A bacteriocin of strain *Pediococcus* spp. ISK-1 isolated from Nukadoko, bed of fermented rice bran.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 61(6), 1049-1051, 1997.

KOBAYASHI, N.; ALAM, M. & URASAWA, S. **Analysis on distribution of insertion sequence IS431 in clinical isolates of staphylococci.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 39(1), 61-64, 2001.

KORDEL, M.; BENZ, R. & SAHL, H.-G. **Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes.** J. Bacteriol., 170(1), 84-88, 1988.

KRUT, O.; UTERMÖHLEN, O.; SCHLOSSHERR, X. & KRÖNKE, M. **Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates.** Infect. Immun., 71, 2716-2723, 2003.

KUPKE, T. & GÖTZ, F. **Expression, purification, and characterization of EpiC, an enzyme involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin, and sequence analysis of *Staphylococcus epidermidis* epiC mutants.** J. Bacteriol., 178(5), 1335-1340, 1996.

LAGOS, R.; TELLO, M.; MERCADO, G.; GARCÍA, V. & MONASTERIO, O. **Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin MccE492, a pore-forming bacteriocin.** Curr. Pharm. Biotechnol., 10, 74-85, 2009.

LAMPERT, Y.; KELMAN, D.; NITZAN, Y.; DUBINSKY, Z.; BEHAR, A. & HILL, R. T. **Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals.** FEMS Microbiol. Ecol., 64(2), 187-198, 2008.

LAVERMICOCCA, P.; LONIGRO, S.L.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A. & VISCONTI A. **Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*.** Appl. Environ. Microbiol., 68(3), 1403-1407, 2002.

LECLERCQ, R. **Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci.** Clin. Microbiol. Infect., 15(3), 224-231, 2009.

LEE, V.T. & SCHNEEWIND, O. **Protein secretion and pathogenesis of bacterial infections.** Genes Develop., 15, 1725-1752, 2001.

LEE, Y. H.; KIM, M.S.; CHOIE, W.S.; MIN, H.K. & LEE, S.W. **Highly informative proteome analysis by combining improved N-terminal sulfonation for de novo peptide sequencing and online capillary reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** Proteomics, 4(6), 1684-1694, 2004.

LEIGH, J.A. ***Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?** Vet. J., 157, 225-238, 1999.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. & PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 10^a ed. São Paulo: Prentice- Hall, 2005.

MAHILLON, J. & CHANDLER, M. **Insertion Sequences.** Microbiol. Mol. Rev., 62(3), 725-774, 1998.

MALDONADO, A.; RUIZ-BARBA, J.L. & JÍMENEZ-DÍAZ, R. **Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria.** Arch. Microbiol., 181(1), 8-16, 2004.

MANICKAM, N.; KNORR, A. & MULDREW, K.L. **Neonatal meningoenephalitis caused by *Bacillus cereus*.** Pediatr. Infect. Dis. J., 27(9), 843-846, 2008.

MAQUEDA, M.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; FERNÁNDEZ, M.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; VALDIVIA, E. & MARTÍNEZ-BUENO, M. **Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria.** FEMS Microbiol. Rev.; 32(1), 2-22, 2008.

MARUGG, J.D.; GONZALEZ, C.F.; KUNKA, B.S.; LEDEBOER, A.M.; PUCCI, M.J.; TOONEM, M.Y.; WALKER, S.A.; ZOETMULDER, L.C. & VANDENBERGH, P.A. **Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0.** Appl. Environ. Microbiol., 58, 2360-2367, 1992.

MAZEL, D. **Integrans: agents of bacterial evolution.** Nat. Rev. Microbiol., 4, 608-620, 2006.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P. & HILL, C. **Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action.** FEMS Microbiol. Rev., 25, 283-308, 2001.

MCKENNEY, D.; POULIO, T.K.L.; WANG, Y.; MURTHY, V.; ULRICH, M.; DORING, G.; LEE, J.C.; GOLDMAN, D.A. & PIER, G.B. **Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen.** Science, 284, 1523-1527, 1999.

MELCHIOR, M.B.; VAN OSCH, M.H.; GRAAT, R.M.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.J.; NIELEN, M.; GAASTRA, W. & FINK-GREMMELS, J. **Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains.** Vet. Microbiol., 137(1-2), 83-89, 2009.

MEMMI, G.; FILIPE, S.R.; PINHO, M.G.; FU, Z. & CHEUNG, A. ***Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for beta-lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains.** Antimicrob. Agents Chemother., 52(11), 3955-3966, 2008.

MESSING, J. **New M13 vectors for cloning.** Meth. Enzymol., 101, 20-78, 1983.

METLITSKAYA, A.; KAZAKOV, T.; VONDENHOFF, G.H.; NOVIKOVA, M.; SHASHKOV, A.; ZATSEPIN, T.; SEMENOVA, E.; ZAITSEVA, N.; RAMENSKY, V.; VAN AERSCHOT, A. & SEVERINOV, K. **Maturation of the translation inhibitor microcin C.** J. Bacteriol., 191(7), 2380-2387, 2009.

MEYER, C.; BIERBAUM, G.; HEIDRICH, C.; REIS, M.; SÜLING, J.; IGLESIAS-WIND, M.I.; KEMPTER, C.; MOLITOR, E. & SAHL, H.-G. **Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC, evidence for a role of PepC in thioether formation.** Eur. J. Biochem., 232(2), 478-489, 1995.

MINAMIKAWA, M.; KAWAI, Y.; INOUE, K.N. & YAMAZAKI, K. **Purification and characterization of warnericin RB4, anti-*Alicyclobacillus* bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4.** Curr. Microbiol., 51, 22-26, 2005.

MORRIS, D.M.; LAWSON, J.W. & ROGOLSKY, M. **Effect of a staphylococcin on *Neisseria gonorrhoeae*.** Antimicrob. Agents Chemother., 14(2), 218-223, 1978.

MURINDA, S.E.; RASHID, K.A. & ROBERTS, R.F. ***In vitro* assessment of the cytotoxicity of nisin, pediocin, and selected colicins on simian virus 40-transfected human colon and Vero monkey kidney cells with trypan blue staining viability assays.** J. Food Prot., 66(5), 847-853, 2003.

NAGAO, J.; HARADA, Y.; SHIOYA, K.; ASO, Y.; ZENDO, T.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Lanthionine introduction into nukacin ISK-1 prepeptide by co-expression with modification enzyme NukM in *Escherichia coli*.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 336(2), 507-513, 2005.

NAKAMURA, T.; YAMAZAKI, N.; TANIGUCHI, H. & FUJIMURA, S. **Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva.** Infect. Immun., 39 (2), 609-614, 1983.

NASCIMENTO, J.S. **Análise da produção de bacteriocinas por estirpes de *Staphylococcus coagulase-negativos* e estudo do papel da *orf12*, da *orf13* e da *orf14* na expressão da aureocina A53.** Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ), 193 p., 2004.

NASCIMENTO, J.S.; SANTOS, K.R.N.; GENTILINI, E.; SORDELLI, D. & BASTOS, M.C.F. **Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis.** Vet. Microbiol., 85, 133-144, 2002.

NASCIMENTO, J.S.; ABRANTES, J.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. & BASTOS, M.C.F. **The influence of growth conditions on the production of bacteriocins by strains of *Staphylococcus aureus*.** World J. Microbiol. Biotechnol., 20, 941-947, 2004.

NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, P.C.; BRITO, M.A.P.; SANTOS, K.R. & BASTOS, M.C.F. **Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis.** Vet. Microbiol., 20, 61-71, 2005.

NASCIMENTO, J.S.; CEOTTO, H.; NASCIMENTO, S.B.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K.R.N. & BASTOS, M.C.F. **Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains.** Lett. Appl. Microbiol., 42: 215-221, 2006.

NAVARATNA, M.A.; SAHL, H.-G. & TAGG J.R. **Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55.** Appl. Environ. Microbiol., 64 (12), 4803-4808, 1998.

NAVARATNA, M.A.; SAHL, H.-G. & TAGG, J.R. **Identification of genes encoding two component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage group II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene.** Infect. Immun., 67 (8), 4268-4271, 1999.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRUBERG, M.B.; EIJSINK, V. & HOLO, H. **Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria.** Antonie van Leeuwenhoek, 70, 113-128, 1996.

NETZ, D.J.A.; SAHL, H.-G.; MARCOLINO, R.; NASCIMENTO, J.S.; OLIVEIRA, S.S.; SOARES, M.B. & BASTOS, M.C.F. **Molecular characterisation of aureocin A70, a multipeptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*.** J. Mol. Biol., 311, 939-949, 2001.

NETZ, D.J.A.; BASTOS, M.C.F. & SAHL, H.-G. **Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*.** Appl. Environ. Microbiol., 68(11), 5274-5280, 2002.

NETZ, D.J.A.; POHL, R.; BECK-SINCKINGER, A.G.; SELMER, T.; PIERIK, A.J.; BASTOS, M.C.F. & SAHL, H.-G. **Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus***. J. Mol. Biol., 319, 745-756, 2002.

NISSEN-MEYER, J.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L.S.; SLETTEN, K. & NES, I.F. **A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides**. J. Bacteriol., 174, 5686-5692, 1992.

NISSEN-MEYER, J.; ROGNE, P.; OPPEGÅRD, C.; HAUGEN, H.S. & KRISTIANSEN, P.E. **Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria**. Curr. Pharm. Biotechnol., 10, 10-37, 2009.

O'CONNOR, E.B.; COTTER, P.D.; O'CONNOR, P.; O'SULLIVAN, O.; TAGG, J.R.; ROSS, R.P. & HILL, C. **Relatedness between the two-component lantibiotics lacticin 3147 and staphylococcin C55 based on structure, genetics and biological activity**. BMC Microbiol., 2, 7-24, 2007.

OKUDA, K.; ASO, Y.; NAGAO, J.; SHIOYA, K.; KANEMASA, Y.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Characterization of functional domains of lantibiotic-binding immunity protein, NukH, from *Staphylococcus warneri* ISK-1**. FEMS Microbiol. Lett., 250(1), 19-25, 2005.

OKUDA, K.; ASO, Y.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Cooperative transport between NukFEG and NukH in immunity against the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1**. J. Bacteriol., 190(1), 356-362, 2008a.

OKUDA, K.; YANAGIHARA, S.; SHIOYA, K.; HARADA, Y.; NAGAO, J.; ASO, Y.; ZENDO, T.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Binding specificity of the lantibiotic-binding immunity protein NukH**. Appl. Environ. Microbiol., 74(24), 7613-7619, 2008b.

OLIVEIRA, S.S.; ABRANTES, J.; CARDOSO, M.; SORDELLI, D. & BASTOS, M.C.F. **Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides**. Lett. Appl. Microbiol., 27, 287-291, 1998a.

OLIVEIRA, S.S.; NASCIMENTO, J.S.; PÓVOA, D.C.; ARAÚJO, S.A.; GAMON, M.R. & BASTOS, M.C.F. **Genetic analysis of the bacteriocin-encoding plasmids pRJ6 and**

pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production. J. Appl. Microbiol., 85, 972-984, 1998b.

OLIVEIRA, S.S.; PÓVOA, D.C.; NASCIMENTO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; JÚNIOR, J.P.S. & BASTOS, M.C.F. **Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle in Brazil.** Lett. Appl. Microbiol., 27, 229-234, 1998c.

O'RIORDAN, K. & LEE, J.C. ***Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides.** Clin. Microbiol. Rev., 17, 218-234, 2004.

OTTO, M. **Staphylococcal biofilms.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 322: 207-228, 2008.

PAG, U.; HEIDRICH, C.; BIERBAUM, G. & SAHL, H.-G. **Molecular analysis of expression of the lantibiotic Pep5 immunity phenotype.** Appl. Environ. Microbiol., 65, 591-598, 1999.

PAPAGIANNI, M. **Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications.** Biotechnol. Adv., 21, 465-499, 2003.

PATRON, R.L.; CLIMO, M.W.; GOLDSTEIN, B.P. & ARCHER, G.L. **Lysostaphin treatment of experimental aortic valve endocarditis caused by a *Staphylococcus aureus* isolate with reduced susceptibility to vancomycin.** Antimicrob. Agents Chemother., 43(7), 1754-1755, 1999.

PESCHEL, A. & GÖTZ, F. **Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *-E*, and *-G* involved in epidermin immunity.** J. Bacteriol., 178(2), 531-536, 1996.

PESCHEL, A.; SCHNELL, N.; HILLE, M.; ENTIAN, K.-D. & SAHL, H.-G. **Secretion of the lantibiotics epidermin and gallidermin: sequence analysis of the genes *gdmT* and *gdmH*, their influence on epidermin production and their regulation by EpiQ.** Mol. Gen. Genet., 254, 312-318, 1997.

PESCHEL, A. & SAHL, H.-G. **The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance.** Nat. Rev. Microbiol., 4(7), 529-536, 2006.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; SELLOS, I.T. & BERGDOLL, M.S. **Staphylococci in breast milk from women with and without mastitis.** Rev. Microbiol., 26 (2), 117-120, 1995.

PETERS, E.C.; HORN, D.M.; TULLY, D.C. & BROCK, A. **A novel multifunctional labeling reagent for enhanced protein characterization with mass spectrometry.** Rapid Commun. Mass Spectrom., 15(24), 2387-2392, 2001.

PETRELLI, D.; ZAMPALONI, C.; D'ERCOLE, S.; PRENNA, M.; BALLARINI, P.; RIPA, S. & VITALI, L.A. **Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 25(12), 773-781, 2006.

POTTER, A.; CEOTTO, H.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K.R.N.; NES, I.F. & BASTOS, M.C.F. **The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections.** J. Microbiol., 47(3), 319-326, 2009.

PYÖRÄÄLÄ, S. & TAPONEN S. **Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens.** Vet. Microbiol., 41-47, 2008.

QUADRI, L.E.N.; SAILER, M.; ROY, K.L.; VEDERAS, J.C. & STILES, M.E. **Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B.** J. Biol. Chem., 269, 12204-12211, 1994.

QUADRI, L.E.N.; KLEEREBEZEM, M.; KUIPERS, O.P.; DE VOS, W.M.; ROY, K.L.; VEDERAS, J.C. & STILES, M.E. **Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation.** J. Bacteriol., 179, 6163-6171, 1997.

RAFFERTY, K. & HEANEY, R.P. **Nutrient effects on the calcium economy: emphasizing the potassium controversy.** J. Nutr., 138(1), 166S-171S, 2008.

RAWOOL, D.B.; MALIK, S.V.; SHAKUNTALA, I.; SAHARE, A.M. & BARBUDDHE, S.B. **Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases.** Int. J. Food Microbiol., 132(2), 20-27, 2007.

REIS, M.; ESCHBACH-BLUDAU, M.; IGLESIAS-WIND, M.I.; KUPKE, T. & SAHL, H.-G. **Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene *pepI* and localization and functional analysis of its gene product.** Appl. Environ. Microbiol., 60(8), 2876-2883, 1994.

RILEY, M.A. & CHAVAN, M.A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. In: Introduction, 1-3. Edited by Riley, M.A. & Chavan, M.A.; Springer, Berlin, 2007.

ROBERTS, A.P.; CHANDLER, M.; COURVALIN, P.; GUÉDON, G.; MULLANY, P.; PEMBROKE, T.; ROOD, J.I.; SMITH, C.J.; SUMMER, A.O.; MASATAKA TSUDA, M. & BERG, D.E. **Revised nomenclature for transposable genetic elements**. *Plasmid*, 60, 167-173, 2008.

RYAN, M.P.; MEANEY, W.J.; ROSS, R.P. & HILL, C. **Evaluation of lacticin 3147 and teat seal containing this bactericin for inhibition of mastitis pathogens**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (6), 2287-2290, 1998.

RYAN, M.P.; JACK, R.W.; JOSTEN, M.; SAHL, H.-G.; JUNG, G.; ROSS, R.P. & HILL, C. **Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147**. *J. Biol. Chem.*, 274, 37544-37550, 1999.

SAEED, S.; RASOOL, S.A.; AHMAD, S. & ALI, S.A. **Antimicrobial spectrum, production and mode of action of staphylococcin 188 produced by *Staphylococcus aureus* 188**. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 17, 1-8, 2004.

SAEED, S.; RASOOL, S.A.; AHMED, S.; KHANUM, T.; KHAN, M.B.; ABBASI, A. & ALI, S.A. **New insight in staphylococcin research: bacteriocin or/and bacteriocin-like inhibitory substance(s) produced by *S. aureus* AB188**. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 713-722, 2006.

SAHL, H.-G. & BRANDIS, H. **Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis***. *J. Gen. Microbiol.*, 127(2), 377-384, 1981.

SAHL, H.-G.; HAHN, C. & BRANDIS, H. **Interaction of the staphylococcin-like peptide Pep 5 with cell walls and isolated cell wall components of Gram-positive bacteria**. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.*, 260(2), 197-205, 1985.

SAHL, H.-G. **Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin: implications for the nature of bacteriocins from Gram-positive bacteria**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 752-755, 1994.

SAHL, H.-G.; PAG. U.; BONNESS, S.; WAGNER, S.; ANTICHEVA, N. & TOSSI, A. **Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity.** J. Leukoc. Biol., 77(4), 466-475, 2005.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y, 1989.

SANG, Y. & BLECHA, F. **Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics.** Anim. Health Res. Rev., 9, 227-235, 2008.

SASHIHARA, T.; KIMURA, H.; HIGUCHI, T.; ADACHI, A.; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. **A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2420-2428, 2000.

SASHIHARA, T.; DAN, M.; KIMURA, H.; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. **The effect of osmotic stress on the production of nukacin ISK-1 from *Staphylococcus warneri* ISK-1.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 496-501, 2001.

SCHNELL, N.; ENTIAN, K.-D.; SCHNEIDER, U.; GÖTZ, F.; ZÄHNER, H.; KELLNER, R. & JUNG, G. **Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings.** Nature, 333, 276-278, 1988.

SCOTT, J.C.; SAHL H.-G.; CARNE, A. & TAGG, J.R. **Lantibiotic-mediated anti-*Lactobacillus* activity of a vaginal *Staphylococcus aureus* isolate.** FEMS Microbiol. Lett.; 72 (1), 97-102, 1992.

Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** Ministério da Saúde (www.saude.gov.br), 2002.

SHAND, R.F. & LEYVA, K.J. **Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins.** In: Bacteriocins: ecology and evolution, 5-17. Edited by Riley, M.A. & Chavan, M.A., Springer, New York, 2007.

SIMMONDS, R.S.; SIMPSON, W.J. & TAGG, J.R. **Cloning and sequence analysis of *zooA*, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin.** *Gene*, 189(2), 255-261, 1997.

SKAUGEN, M.; NISSEN-MEYER, J.; JUNG, G.; STEVANOVIC, S.; SLETTEN, K.; INGER, C.; ABILDGAARD, M. & NES I.F. ***In vivo* conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide.** *J. Biol. Chem.*, 269(44), 27183-27185, 1994.

SOGE, O.O.; BECK, N.K.; WHITE, T.M.; NO, D.B. & ROBERTS, M.C. **A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* *mer* operon.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 62(4), 674-680, 2008.

SRINIVASAN, A.; DICK, J.D. & PERL, T.M. **Vancomycin resistance in staphylococci.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3), 430-438, 2002.

STEC, B. **Plant thionins - the structural perspective.** *Cel. Mol. Life Sci.*, 63, 1370-1385, 2006.

STENFORS-ARNESEN, L.P.; FAGERLUND, A. & GRANUM, P.E. **From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 32(4), 579-606, 2008.

STRAUME, D.; KJOS, M.; NES, I.F. & DIEP, D.B. **Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators.** *Mol. Genet. Genom.*, 278, 283-293, 2007.

THOMPSON, J.K.; COLLINS, M.A. & MERCER, W.D. **Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450.** *J. Appl. Bacteriol.*, 80(3), 338-348, 1996.

TUCHSCHERR, L.P.N.; GOMEZ, M.I.; BUZZOLA, F.R.; CALVINHO, L.F.; LEE, J.C. & SORDELLI, D.O. **Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*.** *Infect. Imm.*, 75, 5483-5488, 2007.

TWOMEY, D.P.; WHEELOCK, A.I.; FLYNN, J.; MEANEY, W.J.; HILL, C. & ROSS, R.P. **Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-**

based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. J. Dairy Sci., 83(9), 1981-1988, 2000.

VALLE, J.; VERGARA-IRIGARAY, M.; MERINO, N.; PENADÉS, J.R. & LASA, I. **Sigma B regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation.** J. Bacteriol., 189(7), 2886-2596, 2007.

VAN DE KAMP, M.; HORSTINK, L.M.; VAN DEN HOOVEN, H.W.; KONINGS, R.N.; HILBERS, C.W.; FREY, A.; SAHL, H.-G.; METZGER, J.W. & VAN DE VEM, F.J. **Sequence analysis by NMR spectroscopy of the peptide lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7.** Eur. J. Biochem., 227(3), 757-771, 1995a.

VAN DE KAMP, M.; VAN DEN HOOVEN, H.W.; KONINGS, R.N.; BIERBAUM, G.; SAHL, H.-G.; KUIPERS, O.P.; SIEZEN, R.J.; DE VOS, W.M.; HILBERS, C.W. & VAN DE VEM, F.J. **Elucidation of the primary structure of the lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7.** Eur. J. Biochem., 230(2), 587-600, 1995b.

VAN DER HOEVEN, R.; BETRABET, G. & FORST, S. **Characterization of the gut bacterial community in *Manduca sexta* and effect of antibiotics on bacterial diversity and nematode reproduction.** FEMS Microbiol. Let., 286(2), 249-256, 2008.

VANDECASTEELE, S.J.; PEETERMANS, W.E.; MERCKX, R. & VAN ELDERE, J. **Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections.** J. Infect. Dis., 188(5), 730-737, 2003.

VANNESTE, J.L.; YU, J. & BEER, S.V. **Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*.** J. Bacteriol., 174, 2785-2796, 1992.

VOLLMER, W.; JORIS, B.; CHARLIER, P. & FOSTER, S. **Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases.** FEMS Microbiol. Rev., 32(2), 259-286, 2008.

VON EIFF, C.; PETERS, G. & HEILMANN, C. **Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci.** Lancet Infect. Dis., 2 (11), 677-685, 2002.

VON EIFF, C.; KOKAI-KUN, J.F.; BECKER, K. & PETERS, G. ***In vitro* activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from anterior nares and blood.** Antimicrob. Agents Chemother., 47, 3613-3615, 2003.

WARREN, R.; ROGOLSKI, M.; WILEY, B.B. & GLASGOW, L.L. **Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 118(3), 980-985, 1974.

WERNER, G.; COQUE, T.M.; HAMMERUM, A.M.; HOPE, R.; HRYNIEWICZ, W.; JOHNSON, A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K.G.; LECLERCQ, R.; LESTER, C.H.; LILLIE, M.; NOVAIS, C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, L.V.; SADOWY, E.; SIMONSEN, G.S.; TOP, J.; VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R.J.; WITTE, W. & WOODFORD, N. **Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe.** Euro Surveill, 13(47), 1-17, 2008.

WILAI PUN, P.; ZENDO, T.; OKUDA, K.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Identification of the nukacin KQU-131, a new type-A (II) lantibiotic produced by *Staphylococcus hominis* KQU-131 isolated from Thai fermented fish product (Pla-Ra).** Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 2232-2235, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report Tuberculosis,** 6-33, 2009.

WU, J.A.; KUSUMA, C. & KOKAI-KUN, J.F. **Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces.** Antimicrob. Agents Chemother., 47(11), 3407-3414, 2003.

XU, Z.; SHI, L.; ZHANG, C.; ZHANG, L.; LI, X.; CAO, Y.; LI, L. & YAMASAKI, S. **Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China.** Clin. Microbiol. Infect., 13(10), 980-984, 2007.

XU, Z.; LI, L.; ALAM, M.J.; ZHANG, L.; YAMASAKI, S. & SHI, L. **First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Curr. Microbiol., 57(3), 264-268, 2008.

YONEYAMA, F.; IMURA, Y.; ICHIMASA, S.; FUJITA, K.; ZENDO, T.; NAKAYAMA, J.; MATSUZAKI, K. & SONOMOTO, K. **Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors.** Appl. Environ. Microbiol., 75(2), 538-541, 2009a.

YONEYAMA, F.; IMURA, Y.; OHNO, K.; ZENDO, T.; NAKAYAMA, J.; MATSUZAKI, K. & SONOMOTO, K. **Peptide-lipid huge toroidal pore: a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53(8): 3211-3217, 2009b.

ZHAO, X. & LACASSE, P. **Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control.** *J. Anim. Sci.*, 86, 57-65, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)