

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Giovana Flávia Rosin

Proteínas recombinantes:

Produção da Enzima Transcritase Reversa do Vírus Murino da

Leucemia de Moloney (M-MLV-RT) e

Avaliação do Efeito Antimicrobiano da Subunidade Beta da Urease

de *Proteus mirabilis*

Porto Alegre

2022

Giovana Flávia Rosin

Proteínas recombinantes:

Produção da Enzima Transcriptase Reversa do Vírus Murino da Leucemia
de Moloney (M-MLV-RT) e

Avaliação do Efeito Antimicrobiano da Subunidade Beta da Urease de
Proteus mirabilis

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel com ênfase em Biotecnologia Molecular
do Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Giancarlo Pasquali

Co-orientadora: Fernanda Cortez Lopes

Porto Alegre

2022

RESUMO

Proteínas recombinantes são de suma importância no contexto médico, na indústria e na pesquisa. Neste trabalho, duas proteínas recombinantes de interesse biotecnológico foram produzidas e purificadas: a Transcriptase Reversa do Vírus Murino da Leucemia de Moloney (M-MLV-RT) e a subunidade Beta da Urease de *Proteus mirabilis* (PmUreβ). A M-MLV-RT é a transcriptase reversa de maior uso comercial, com aplicações tanto para a pesquisa quanto para o diagnóstico clínico. Em 2020, com a pandemia de COVID-19, houve aumentos de preços e falta de M-MLV-RT no país, afetando a pesquisa de diferentes áreas que fazem uso desse insumo, bem como o diagnóstico de SARS-CoV-2. Assim, foi desenvolvido um protocolo inicial para a produção da enzima pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS. Neste trabalho, objetivamos a otimização da produção desta enzima, a fim de tornar a produção mais estável no futuro, e o teste de sua atividade enzimática. A transformação foi identificada como maior gargalo da produção da enzima e os parâmetros testados, assim como o uso de diferentes linhagens para a expressão (*E. coli* BL21(DE3) pTGroE e *E. coli* Lemo21), não foram suficientes para melhorar a eficiência da transformação. Já a atividade enzimática foi satisfatória em comparação com enzimas comerciais fornecidas pelas empresas Qiagen, Sigma e iScript, especialmente com o tempo de incubação de 30 minutos, inclusive após 6 meses de estoque da enzima a -20 °C. A PmUreβ, segunda proteína produzida neste trabalho, é uma subunidade da urease de *P. mirabilis*. A PMU é um fator de virulência capaz de realizar a hidrólise da ureia, aumentando o pH do meio e proporcionando a sobrevivência e colonização de *P. mirabilis* no trato urinário humano. Esta enzima apresenta toxicidade contra insetos e leveduras e tal atividade não está relacionada à propriedade catalítica, observada também quando se testa isoladamente apenas a sua subunidade beta, PmUreβ. Neste trabalho, avaliamos a atividade antibacteriana desta proteína contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em meio contendo diferentes concentrações de PmUreβ (0,56, 1,125, 2,25 e 4,5 μM). Não observamos inibição do crescimento das colônias de *P. aeruginosa* para as concentrações testadas, mas se obteve redução da multiplicação bacteriana de *S. aureus* para a concentração de 1,125 μM (P<0,05). Mais estudos serão necessários para melhor caracterizar o potencial antibacteriano de PmUreβ.

Palavras-chave: Proteína recombinante. M-MLV-RT. Transcriptase reversa. PmUreβ. Urease. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Recombinant proteins are extremely important in medical terms as well as in industry and research. In this work two recombinant proteins with biotechnological interest were produced and purified: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV-RT) and the beta subunit from *Proteus mirabilis* urease (PmUreβ). M-MLV-RT is the most commercially used reverse transcriptase, with applications both in research and clinical diagnosis. In 2020, with the COVID-19 pandemic, there was an increase in prices and lack of M-MLV-RT in Brazil, affecting the research of different areas that use this enzyme, as well as the diagnosis of SARS-CoV-2. Thus, a protocol to produce this enzyme was developed by researchers of the Center for Biotechnology, UFRGS. In this present work, we aimed to optimize the production of M-MLV-RT in order to have a more stable protocol in the future and also to test its enzymatic activity. The transformation process was identified as the major bottleneck to enzyme production, and tested parameters, as well as the different strains used (*E. coli* BL21(DE3) pTGroE e *E. coli* Lemo21) were not sufficient to improve transformation efficiency. The enzymatic activity, however, was satisfactory in comparison with commercial enzymes yielded by Qiagen, Sigma and iScript, especially with 30 min incubation, even after 6 months of storage at -20 °C. PmUreβ, the second protein produced in this work, is a subunit from *P. mirabilis* urease (PMU). PMU is a virulence factor that hydrolyzes urea, increasing environmental pH and allowing the survival and colonization of *P. mirabilis* in the human urinary tract. This enzyme also presents toxicity against insects and yeasts and such activity is not related to its catalytic property. These activities are observed when the isolated subunit beta, PmUreβ, is tested. In this work, we evaluated the antibacterial activity of this protein against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, testing different concentrations of PmUreβ (0.56, 1.125, 2.25, and 4.5 μM). We did not observe growth inhibition of *P. aeruginosa* under tested doses. However we observed reduction of *S. aureus* growth when 1.125 μM concentration was used (P<0,05). Additional studies will be necessary to better comprehend the antibacterial activity of PmUreβ.

Keywords: Recombinant protein. M-MLV-RT. Reverse transcriptase. PmUreβ. Urease. Antibacterial activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	Proteínas Recombinantes	6
1.2	Transcritase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney	6
1.3	Subunidade Beta da Urease de <i>Proteus mirabilis</i>	8
1.3.1	<i>Proteus mirabilis</i>	8
1.3.2	Urease de <i>Proteus mirabilis</i>	9
1.3.3	Toxicidade da Subunidade Beta da Urease de <i>Proteus mirabilis</i>	10
1.3.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	M-MLV-RT.....	14
3.1.1	Transformação de pET23a:: <i>M-MLV-RT</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pT-GroE e em <i>E. coli</i> Lemo21	14
3.1.2	Transformação, purificação e sequenciamento do plasmídeo pET23a:: <i>MMLV-RT</i> estocado em <i>E. coli</i> DH5 α	16
3.1.3	Expressão induzível de M-MLV-RT em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pT-GroE e em <i>E. coli</i> Lemo21 para a seleção de clones	16
3.1.4	Expressão induzível e purificação de M-MLV-RT em escala laboratorial	17
3.1.5	Teste de atividade da M-MLV-RT	18
3.2	PmUre β	19
3.2.1	Transformação de pET23a:: <i>ureB</i> em <i>E. coli</i> Lemo21 (DE3) e seleção de clones	19
3.2.2	Expressão induzível e purificação de PmUre β em escala laboratorial	20
3.2.3	Ensaio antibacteriano	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Transformação pET23a:: <i>M-MLV-RT</i> em <i>E. coli</i> DH5 α e Sequenciamento do Plasmídeo ...	21
4.2	Transformações de pET23a:: <i>M-MLV-RT</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pTGroE e Seleção de Clones	22
4.3	Atividade M-MLV-RT em RT-qPCR	25
4.4	Expressão de PmUre β	27

4.5	Ensaio antibacteriano	28
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVA.....	31
	BIBLIOGRAFIA.....	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas Recombinantes

A produção de proteínas recombinantes é baseada na tecnologia do DNA recombinante. Assim, é possível isolar genes de organismos de qualquer espécie, cloná-los e inseri-los em um sistema de expressão para que ocorra a produção, induzível ou não, da proteína recombinante e sua posterior purificação. O desenvolvimento dessa tecnologia só foi possível a partir de uma série de descobertas científicas das décadas de 1960 e 1970, como a interpretação do código genético, a descoberta de enzimas de restrição e a criação do primeiro organismo geneticamente modificado (PHAM, 2018).

Em 1982, a insulina recombinante foi aprovada nos Estados Unidos como a primeira proteína recombinante para fins terapêuticos a ser comercializada. Essa tecnologia permitiu a produção do hormônio por *Escherichia coli* em grande escala, com maior pureza e qualidade consistente quando comparada ao método anterior de extração a partir do pâncreas de animais (LANDGRAF; SANDOW, 2016; QUIANZON; CHEIKH, 2012). Desde então, a produção de proteínas recombinantes tornou-se lugar comum tanto com a produção de biofármacos e biossimilares para tratamento médico como, também, com o uso de proteínas na indústria e na pesquisa (PHAM, 2018).

Neste trabalho, duas proteínas recombinantes de interesse biotecnológico foram produzidas e purificadas: a Transcritase Reversa do Vírus Murino da Leucemia de Moloney (M-MLV-RT) e a subunidade Beta da Urease de *Proteus mirabilis* (PmUreβ), as quais foram estudadas quanto à atividade enzimática da primeira e a propriedade antibacteriana da segunda proteína.

1.2 Transcritase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney

Transcritases reversas (TRs ou RTs, do inglês, *reverse transcriptases*) são enzimas capazes de gerar DNA complementar (cDNA) a partir de RNA. Esse processo é utilizado por retrovírus para a replicação de seu genoma, para a proliferação de retrotransposons e por células eucarióticas para a extensão de seus telômeros (TELESNITSKY; GOFF, 1997).

A Transcriptase Reversa do Vírus Murino da Leucemia de Moloney (M-MLV-RT, do inglês, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) foi uma das primeiras TRs a serem descobertas (ROTH; TANESE; GOFF, 1985) e foi utilizada como modelo para o estudo da estrutura e propriedades físico-químicas desta classe de enzimas. Codificada por um gene da região *gag-pol* viral, é traduzida e processada a partir da poliproteína GAG-POL de 1.738 aminoácidos de comprimento. A M-MLV-RT é o produto da clivagem da região de 660 a 1.330 aminoácidos do polipeptídeo pela ação de proteases virais. A M-MLV-RT é um monômero de 71 kDa, com comprimento de 671 aminoácidos e dois principais domínios: um de polimerase e outro de ribonuclease H (RNase H). O domínio de polimerase possui duas atividades catalíticas: a síntese de DNA dependente de RNA e a síntese de DNA dependente de DNA (CHAMPOUX; SCHULTZ, 2009; OSCORBIN; FILIPENKO, 2021).

Atualmente, a M-MLV-RT é a TR mais utilizada comercialmente para a síntese de cDNA e, a partir deste e de forma indireta, pela amplificação de RNAs, devido à sua alta fidelidade e eficiente atividade catalítica (MOHR et al., 2013). Essas funcionalidades da enzima são aplicadas tanto para a pesquisa quanto para o diagnóstico, principalmente para amplificação, detecção e quantificação de RNA (BUSTIN, 2000; LIBUS; STORCHOVÁ, 2006); construção de bibliotecas de cDNA para o isolamento de genes (GUBLER; HOFFMAN, 1983); sequenciamento massivo de RNAs ou transcritômica, incluindo o conjunto de técnicas de *RNA-Seq* (LOWE et al., 2017).

Muitas das enzimas comerciais são modificadas para possuir qualidades aprimoradas, especialmente a fidelidade de síntese e redução da atividade de RNase H. Dentre as variantes de M-MLV-RTs, a *SuperScript II* RT (Invitrogen) é uma das mais usadas e pesquisadas. Comparada com enzimas *wild-type*, possui atividade de RNase H reduzida e termoestabilidade aumentada. Desse modo, evita a degradação de RNA na síntese da primeira fita de cDNA e gera maior rendimento de cDNA, sendo de grande sensibilidade e utilidade para amostras com quantidades baixas de RNA (OKELLO et al., 2010).

A produção de M-MLV-RT recombinante em *E. coli* e a purificação foram descritas primeiramente em ROTH et al. (1985) e KOTEWICHS et al. (1985). Mais recentemente, CHEN et al. (2009) obtiveram sucesso em produzir a enzima em grandes quantidades por meio da coexpressão de chaperonas GroEL-GroES em *E. coli* (21 mg de M-MLV-RT produzidas a partir de um litro de cultivo). Nos laboratórios do Centro de Biotecnologia da UFRGS, foi demonstrada a capacidade de produção de M-MLV-RT *SuperScriptII* em escala

laboratorial a partir de culturas de *E. coli* em volumes de até um litro (F.C. Lopes, comunicação pessoal).

O Brasil possui alta dependência do mercado externo para a obtenção de diversos insumos para fins de pesquisa e clínicos. Em 2020, com o início da pandemia de COVID-19 causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, houve escassez e consequente aumento de preços de vários destes insumos (BOTÃO; FERRAZ; SERVILHA, 2021; ORTIZ; LOBATO, 2019). Enzimas como a M-MLV-RT, essencial para a realização de testes de reação em cadeia da DNA polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR, do inglês, *reverse transcription-polymerase chain reaction*) e diagnóstico da COVID-19, também esteve em falta neste período. Esta escassez de insumos e, de modo geral, a dependência do país ao mercado externo, não apenas contribuiu para uma resposta tardia e insuficiente de testagem e identificação de variantes mas, também, afetou o trabalho de pesquisa de diferentes áreas que fazem uso desses insumos (BOTÃO; FERRAZ; SERVILHA, 2021). Desse modo, buscamos o desenvolvimento de um protocolo para a produção da enzima pelo Centro de Biotecnologia, tanto para uso interno quanto para abastecimento de outros laboratórios e possível comercialização posterior. Neste trabalho, foram encontrados alguns gargalos de produção, utilizando a metodologia até então empregada, comprometendo o rendimento e a consistência da produção da enzima recombinante. Assim, neste trabalho, estes métodos foram avaliados com a intenção de otimizar e tornar a produção mais estável no futuro.

1.3 Subunidade Beta da Urease de *Proteus mirabilis*

1.3.1 *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis é uma bactéria uropatogênica oportunista, sendo classificada como a terceira maior causadora de infecções no trato urinário (BAHASHWAN; SHAFETY, 2013). Esta bactéria pertence ao gênero *Proteus* que faz parte da família Enterobacteriaceae. O gênero *Proteus* é encontrado principalmente no solo e em águas contaminadas, bem como no trato intestinal de diferentes animais participando da decomposição de matéria orgânica (GIBBS; GREENBERG, 2011; JACOBSEN *et al.*, 2008). *P. mirabilis* é uma bactéria Gram-negativa, móvel, apresentando diferenciação celular *swimming/swarming* em resposta ao

meio, contribuindo na colonização de superfícies sólidas (MANOS; BELAS, 2006; RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997).

Complicações causadas pelas infecções por *P. mirabilis* incluem cistite, pielonefrite, urolitíase, prostatites, além de representar mais de 44 % das infecções urinárias associadas ao uso de cateteres nos Estados Unidos (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012). A população feminina apresenta maior propensão a infecções no trato urinário (UTIs, do inglês, *urinary tract infections*), sendo os riscos aumentados em mulheres grávidas e idosos. O maior risco é verificado em pacientes hospitalizados, principalmente quando é necessário o uso prolongado de cateteres pelos pacientes, independentemente de sexo e/ou idade (MAGLIANO et al., 2012). Estes altos índices de contaminação podem ser explicados devido à presença da bactéria na microbiota intestinal de humanos, resultando em autocontaminação e alta transmissão entre pacientes hospitalizados (CHOW et al., 1979; RÓZALSKI et al., 1997; COKER et al., 2000; MANOS & BELAS, 2006).

Dentre os mecanismos de desenvolvimento e de defesa de *P. mirabilis* no hospedeiro estão a produção de fatores de virulência, os quais são importantes para colonização e manutenção das infecções urinárias associadas. Estes fatores de virulência são sintetizados pela bactéria, protegendo-a de eliminação por enzimas ou pelo sistema imunológico do hospedeiro (COKER et al., 2000). Dentre estes, a urease de *P. mirabilis* (PMU) atua na hidrólise da ureia presente na urina, aumentando o pH do meio e proporcionando a sua sobrevivência e colonização do trato urinário (JOHNSON, D E et al., 1993).

1.3.2 Urease de *Proteus mirabilis*

Ureases (EC 3.5.1.5) são amino-hidrolases dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono (BLAKELEY et al., 1969; MOBLEY; HAUSINGER, 1989). A hidrólise da ureia causa aumento do pH do meio devido à liberação de amônia, podendo causar graves consequências à saúde de humanos bem como à agricultura (FOLLMER, 2008; MOBLEY; HAUSINGER, 1989).

As ureases são encontradas em plantas, algas, bactérias e fungos (MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Uma das ureases de feijão-de-porco ou *jackbean* (*Canavalia ensiformis*) denominada JBU (*jackbean urease*) foi, em 1926, a primeira enzima a ser

cristalizada. Este trabalho demonstrou pela primeira vez que enzimas são proteínas, proporcionando avanços fundamentais para a bioquímica (SUMNER, 1926). Ureases vegetais, assim como as ureases provenientes de fungos, apresentam-se como trímeros ou hexâmeros com apenas uma subunidade estrutural (α), enquanto que as ureases bacterianas são multímeros complexos, formados por duas (α e β) ou três (α , β e γ) subunidades (BECKER-RITT; CARLINI, 2012; LIGABUE-BRAUN *et al.*, 2013; OLIVERA-SEVERO; WASSERMANN; CARLINI, 2006).

A urease de *P. mirabilis* (PMU), quando em solução, apresenta-se como um trímero de trímeros ($\alpha\beta\gamma$)₃, com massa molar de aproximadamente 280 kDa (COKER *et al.*, 2000; JONES; MOBLEY, 1987). A enzima tem sua expressão induzida pela presença de ureia, sendo codificada por um cístron em um operon composto por 8 genes. O operon da PMU é composto pelos genes estruturais *ureA*, *ureB* e *ureC*, os quais codificam as subunidades UreA (PmUre γ), UreB (PmUre β) e UreC (PmUre α) da enzima, com 11, 12,2 e 61 kDa, respectivamente (BROLL *et al.*, 2021).

Os genes *ureD*, *ureE*, *ureF* e *ureG* codificam proteínas acessórias responsáveis pela montagem da PMU (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). O oitavo gene que compõe o operon da urease de *P. mirabilis* é o gene *ureR*, que codifica um fator de transcrição do operon da PMU ativo na presença de ureia (DATTELBAUM *et al.*, 2003).

Conforme descrito anteriormente, a PMU é considerada um fator de virulência. Sem ela, a bactéria não é capaz de causar ou manter a infecção no hospedeiro (JOHNSON *et al.*, 1993). A hidrólise da ureia promove um aumento no pH da urina de 6,5 para 9,0, fazendo com que sais antes solúveis na urina passem a precipitar, formando cálculos e consequentes danos tissulares (JONES & MOBLEY, H. L T, 1989; FOLLMER, 2010).

1.3.3 Toxicidade da Subunidade Beta da Urease de *Proteus mirabilis*

Além da importância da PMU como fator de virulência devido à sua atividade hidrolítica, também foi reportada toxicidade não relacionada à sua função enzimática. A toxicidade de ureases foi documentada pela primeira vez por CARLINI e GUIMARÃES em 1981, quando purificaram uma proteína nomeada canatoxina (CNTX) a partir de *C. ensiformis*, uma isoforma da JBU, capaz de provocar convulsões e morte quando administrada

intraperitonealmente a ratos e camundongos ($DL_{50} = 0,5$ a $2,0$ mg/kg) (CARLINI & GUIMARÃES, 1981).

Mais tarde, observou-se que essa toxicidade presente em ureases de plantas também era encontrada em ureases bacterianas, com efeitos pró-inflamatórios (UBERTI et al., 2013), indução de agregação plaquetária (OLIVERA-SEVERO et al., 2006; WASSERMANN et al., 2010), bem como atividade entomotóxica e antifúngica (LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015).

Em estudo recente, avaliou-se a toxicidade da urease de *P. mirabilis* em sua forma íntegra e também das suas subunidades PmUre α , PmUre β e PmUre γ separadamente. Observou-se que PmUre β é o maior responsável por causar agregação plaquetária, pelas atividades entomotóxica e antifúngica, quando testado contra plaquetas humanas, contra os insetos *Dysdercus peruvianus* e *Rhodnius prolixus*, além das leveduras *Candida albicans* e *C. parapsilosis* (BROLL et al., 2021).

Tendo em vista esses achados, demonstrando o potencial biotecnológico deste peptídeo, no presente trabalho buscamos investigar a atividade antibacteriana de PmUre β , especialmente contra duas bactérias de interesse médico, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva de formato arredondado que se organiza em isolados, pares, cadeias curtas ou em agrupamentos de formato semelhante a cachos de uva. Estes cocos são também catalase-positivos e a única espécie do gênero *Staphylococcus* coagulase-positiva, com aproximadamente $0,5$ a $1,5$ μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados (SANTOS et al., 2007). Em meio de cultura, essas bactérias formam colônias amareladas e são capazes de se multiplicar de modo aeróbio ou anaeróbio, sob temperaturas de 17 a 40 °C (LOWY, 1998; TAYLOR; UNAKAL, 2022).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies, sendo *S. aureus* a espécie de maior interesse médico, relacionada a diversas infecções. A bactéria é tanto um comensal quanto um patógeno em seres humanos, encontrada na pele e nas mucosas como boca, nariz e

intestino, além do ambiente. Estima-se que metade da população é portadora, com aproximadamente 20% da população carregando persistentemente a bactéria em suas narinas (BROWN *et al.*, 2014). A infecção se dá quando a bactéria invade a corrente sanguínea ou tecidos internos através de uma fissura na pele ou na mucosa, podendo causar infecções cutâneas ou infecções sistêmicas potencialmente fatais. Intervenções cirúrgicas e o uso de cateteres intravenosos são potenciais formas de facilitação de invasão por *S. aureus* na corrente sanguínea e o desenvolvimento de bacteremia. Por sua vez, a bacteremia pode levar à disseminação da infecção causando endocardites, osteomielites, pioartrites e formação de abscessos na pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro. Também pode causar bronco-pneumonia estafilocócica e pneumonia nosocomial associada a outras doenças pulmonares, entubação e infecções alimentares a partir de produção de endotoxinas no seu crescimento em alimentos contaminados (SANTOS *et al.*, 2007).

O tratamento das infecções causadas por *S. aureus* é baseado principalmente no uso de penicilinas para linhagens sensíveis à meticilina (MSSA, do inglês, *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*), recorrendo-se à vancomicina no caso de linhagens de múltipla resistência como a MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), resistente à meticilina, nafcilina, oxacilina e cefalosporinas (HAMOUDI; PALMER; KING, 1983; TAYLOR; UNAKAL, 2022).

1.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria oportunista patogênica que causa infecções em animais e plantas. Em humanos, afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos e é um dos principais organismos causadores de infecções nosocomiais, adquiridas após internação hospitalar (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). A bactéria é baciliforme, Gram-negativa, móvel, apresentando um único flagelo e não-esporulada. É considerada também um microrganismo ubíquo, podendo ser encontrado tanto no solo e água quanto em animais e plantas, e pode ser isolada de feridas, infecções nosocomiais, urinárias e pulmonares, equipamentos médicos, pias e banheiros. Causa pneumonia, bacteremia, dermatite, infecção gastrointestinal, infecções de pele e de tecidos moles, infecção pulmonar, infecção de ossos e articulações, entre outras (AZAM; KHAN, 2019).

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a diferentes agentes antimicrobianos e algumas linhagens desenvolveram resistência à maioria dos antimicrobianos disponíveis, incluindo carbapenemos e cefalosporinas de terceira geração (AZAM; KHAN, 2019). Na Europa, a resistência ao carbapenem é comum na maioria dos países, variando de 1 a 5% em quatro de 41 países, e acima de 50% em seis países (ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE IN EUROPE 2022 - 2020 DATA, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir duas proteínas recombinantes de interesse biotecnológico: a Transcriptase Reversa do Vírus Murino da Leucemia de Moloney (M-MLV-RT) e a subunidade Beta da Urease de *Proteus mirabilis* (PmUreβ), e avaliá-las de acordo com suas atividades enzimática e antibacteriana, respectivamente.

2.2 Objetivos Específicos

1. Obter linhagens recombinantes de *E. coli* capazes de expressão induzível do gene da M-MLV-RT;
2. Purificar M-MLV-RT por cromatografia de afinidade ao níquel a partir de extratos proteicos de *E. coli*;
3. Quantificar os níveis proteicos de M-MLV-RT purificados e avaliar a pureza e a identidade da proteína por SDS-PAGE e *Western Blot*;
4. Medir a atividade enzimática da M-MLV-RT por RT-PCR;
5. Avaliar a eficiência de transformação e de produção proteica para diferentes linhagens de *E. coli*, incluindo *E. coli* BL21(DE3) pTGroE e *E. coli* Lemo21;

6. Obter linhagens recombinantes de *E. coli* BL21(DE3) Lemo21 para a expressão induzível do gene da PmUreβ;
7. Purificar PmUreβ por cromatografia de afinidade ao níquel a partir de extratos proteicos de *E. coli*;
8. Quantificar os níveis proteicos de PmUreβ purificados e avaliar a pureza e a identidade proteica por SDS-PAGE e *Western Blot*;
9. Avaliar o efeito da PmUreβ sobre a multiplicação de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 M-MLV-RT

3.1.1 Transformação de pET23a::M-MLV-RT em *E. coli* BL21(DE3) pT-GroE e em *E. coli* Lemo21

O plasmídeo pET23a::M-MLV-RT foi adquirido da síntese da sequência *SuperScript II* RT modificada, inserida no vetor pET23a pela empresa FastBio Ltda. Células *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE e *E. coli* (DE3) Lemo21 foram tornadas termocompetentes utilizando CaCl₂ e armazenadas em *ultrafreezer* a -80 °C. As transformações realizadas neste trabalho foram executadas de maneira semelhante, com pequenas modificações, apresentadas na Tabela 1. Em um microtubo foi adicionado um determinado volume do plasmídeo pET23a::M-MLV-RT, variando de acordo com a concentração utilizada e 200 µL de células termocompetentes, sendo em seguida realizado o choque térmico em banho seco a 42 °C por dois minutos (ou 45 s para a transformação número 4). As células foram recuperadas com a adição de 1 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) ou Super Optimal Broth (SOB) (HANAHAN, 1983), com adição de glicose a 4 mM ou não, e a incubação por 1 h a 37 °C em agitador orbital a 180 rpm. A seguir, 100 µL das células foram distribuídas por *spread plate* em placa contendo LB-água, ampicilina a 100 µg/mL e cloranfenicol a 40 µg/mL. As células foram anteriormente concentradas por centrifugação a baixa velocidade por 1 min ou não. Após incubação *overnight* em estufa a 37 °C, colônias transformadas foram inoculadas em meio LB contendo

os devidos antibióticos, sendo uma fração destes inóculos aliquoteados e armazenados com adição de 20% de glicerol a -80° C e a outra utilizada para o teste de seleção de clones.

Tabela 1: Transformações de pET23a::M-MLV-RT em *E. coli* BL21(DE3) pT-GroE e em *E. coli* Lemo21.

Na tabela, estão enumeradas as condições de transformação realizadas, incluindo a alíquota de plasmídeo utilizada (e com a sua concentração entre parênteses), a quantidade de plasmídeo adicionada, o meio para a recuperação de células utilizado, se foi realizada concentração anterior ao plaqueamento, o tempo do choque térmico em banho seco a 42 °C, e se houve adição de glicose a 4 mM.

		Plasm. (ng/μL)	Qt. Plasm. (ng)	Estoque plasm.	Meio	Concen.	Banho	Glicose (4 mM)
1	pTGroE	1 (485)	970	- 80 °C	LB	Sim	2'	Não
2		2 (755)	755	- 80 °C	LB	Sim	2'	Não
3		2	1510	- 80 °C	SOB	Sim	3'	Não
4		2	1510	- 80 °C	SOB	Sim	45s 2'	Não
5		3 (422) 2	1688 2984	- 80 °C	SOB	Sim	2'	Sim
6		3	1688	- 20 °C	SOB	Não	2'	Sim
7		4 (502)	2510	- 20 °C	LB	Não	2'	Sim
8		3	1899	- 20 °C	LB	Não	2'	Sim
9		4 3 5 (740)	2500	- 20 °C	LB	Não	2'	Não
10		2 3	800	- 20 °C	LB	Não	2'	Não
11		6 (667)	800	- 20 °C	LB	Não	2'	Não
12		6	800	-20 °C	LB	Não	2'	Não
1	Lemo21	6	800	- 20 °C	LB	Não	2'	Não
2		6	800	- 20 °C	LB	Não	2'	Não

3.1.2 Transformação, purificação e sequenciamento do plasmídeo pET23a::MMLV-RT estocado em *E. coli* DH5 α

As transformações de *E. coli* DH5 α foram realizadas de maneira similar à descrita anteriormente. Porém, fez-se uso de ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a seleção de transformantes, exclusivamente. A purificação de plasmídeos foi realizada com o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. A concentração de plasmídeos foi medida utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Uma alíquota do plasmídeo 6 (Tabela 1) foi enviada para sequenciamento automático de DNA pelo método modificado de Sanger pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (IECBiot/UFRGS), utilizando os pares de *primers* para promotor T7. Esta amostra foi purificada a partir de *E. coli* DH5 α ::pET23a::M-MLV-RT estocadas a -80°C obtidas em experimentos anteriores à realização deste trabalho. A cultura foi cultivada *overnight* em meio LB na presença de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C e agitação contínua, sendo em seguida submetida à purificação, quantificação e enviada para o sequenciamento.

O resultado do sequenciamento foi recebido no formato de eletroferograma e também de sequência (arquivo de texto). Utilizando o *software Chromas* (<http://technelysium.com.au/wp/>) para visualização do eletroferograma, a sequência foi curada manualmente e submetida ao alinhamento contra o banco de dados público do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) referente ao M-MLV por BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

3.1.3 Expressão induzível de M-MLV-RT em *E. coli* BL21(DE3) pT-GroE e em *E. coli* Lemo21 para a seleção de clones

Para *E. coli* BL21(DE3) pTGroE, foi induzida a expressão em 5 mL para a seleção do clone com maior quantidade da proteína recombinante. Em tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL, foram adicionados 5 mL de meio LB, antibióticos (ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e cloranfenicol a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 200 μL de pré-inóculo (4%). As células foram incubadas a 37°C

em agitação constante (180 rpm) até atingir a $OD_{600nm} = 0,7 - 0,8$, seguido da adição de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM e redução da temperatura de cultivo para 20 °C.

Para células *E. coli* Lemo21, a indução da expressão foi realizada em frascos Erlenmeyer contendo 25 mL de meio LB e 500 μ L (2%) de inóculo nas mesmas condições descritas acima. Ao atingir a $OD_{600nm} = 0,7 - 0,8$, a indução foi realizada com a adição de IPTG (0,5 mM) e de diferentes concentrações de ramnose (100, 250, 500 e 1.000 μ M). As bactérias *E. coli* Lemo21 possuem um plasmídeo carregando o gene da lisozima T7, um inibidor da RNA polimerase T7, sob controle de expressão do promotor de ramnose. Desse modo, com a elaboração de uma curva de concentrações crescentes de ramnose, é possível controlar a expressão gênica e a produção de proteína a partir da indução do promotor T7, podendo-se otimizar a expressão, principalmente para proteínas com tendência a formar corpos de inclusão. Por fim, a temperatura de cultivo foi diminuída para 18 °C. As condições utilizadas para a expressão com esta bactéria foram baseadas no protocolo de expressão de PmUre β .

Após incubação *overnight*, as culturas foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 min e os sedimentos (*pellets*) foram ressuspendidos em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,8) e incubados com a adição de lisozima (20 mg/mL) por 20 min à temperatura ambiente. Após esta etapa, os extratos brutos foram submetidos à ultrassonicação de banho por 10 min, congelados por 10 min a -20 °C e centrifugados a 14,000 x g por 20 min, reservando-se o sobrenadante (fração solúvel).

A presença de proteínas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sob condições desnaturantes induzidas por dodecil sulfato de sódio (SDS) (GALLAGHER, 2012) na concentração de 10%, utilizando amostras de culturas não induzidas de cada clone como controles negativos da expressão, seguida de *Dot Blot* ou *Western Blot* com o anticorpo monoclonal anti-His-tag 1:2.000 (Sigma-Aldrich). Avaliou-se a presença das bandas proteicas nas alturas de 76 kDa para a seleção de clone com maior produção da proteína de interesse.

3.1.4 Expressão induzível e purificação de M-MLV-RT em escala laboratorial

Dois frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 250 mL de meio SOB foram utilizados para o cultivo nas condições de indução previamente descritas, à exceção do uso de lactose em lugar de IPTG para a indução. O meio de cultivo foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl (Tris a 20 mM, NaCl a 300 mM, pH 8,0) contendo imidazol a 25 mM. As células foram lisadas por ultrassonicação de ponta e centrifugadas a 14.000 x g por 40 min. O extrato proteico bruto foi submetido à cromatografia de afinidade em matriz *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) contendo NiCl₂ a 0,2 M e, subsequentemente, lavado com tampão Tris-HCl e quantidades crescentes de imidazol (25, 85 e 500 mM). A proteína foi eluída com o tampão contendo 500 mM de imidazol.

O eluato foi dialisado em tampão Tris-HCl (Tris a 50 mM, NaCl a 100 mM, EDTA a 0,1 mM) e ditioneitol (DTT a 1 mM, pH 7,5). O método Bradford (BRADFORD, 1976) foi empregado para a quantificação proteica e a pureza foi avaliada por SDS-PAGE a 10 %, seguida de *Western Blot*. As amostras foram concentradas por centrifugação a 4000 g por 20 min utilizando filtro para centrifugação Amicon (Merck) de 10 kDa e então armazenadas com glicerol a 50 % na concentração de 0,35 mg/mL a -20 °C. Essa concentração foi equivalente a 200 U/μL, como estabelecido em experimentos anteriores.

3.1.5 Teste de atividade da M-MLV-RT

A atividade da M-MLV-RT foi testada a partir da síntese de cDNA em ensaios de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) ou *Real Time* RT-PCR. Utilizou-se a enzima produzida no lote 4 (a partir daqui referida simplesmente como M-MLV-RT CBIot), anterior à execução deste trabalho (Tabela 2). A partir de células humanas de *cumulus* cedidas pela empresa Oстера Ltda. (IECBiot/UFRGS), foram extraídas amostras de RNA total pelo método de Trizol (HUMMON et al., 2007). O RNA extraído foi utilizado para o teste da enzima com 15 min, 30 min e 1 h de incubação, sendo comparado com M-MLV-RTs comerciais das marcas Qiagen, Sigma e iScript.

A síntese de cDNA da enzima deste trabalho, assim como para a enzima da Sigma e da Qiagen, foi realizada com os reagentes e protocolo da Qiagen (*RT2 First Strand Kit*, Qiagen), apenas substituindo a M-MLV-RT, e realizando a incubação por 15 min, 30 min e 1

h para a M-MLV-RT CBIot. Já para a TR da iScript, utilizaram-se os reagentes do *kit* e se seguiu o protocolo próprio da marca (*iScript cDNA Synthesis Kit*).

Os produtos da reação foram amplificados por RT-qPCR (BioRad CFX384 *Touch Real-Time PCR System*) em duplicata, nas seguintes condições (5 min a 95 °C, e 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C e 30 s a 72 °C), adicionando-se ao cDNA dNTPs (Ludwig Biotech Ltda.), Taq DNA Polimerase, Tampão 10x e MgCl₂ (Ludwig Biotech Ltda.), ROX *Reference Dye* (Invitrogen), *SYBR Green* (Applied Biosystems) e utilizados 3 *primers* específicos aos genes aqui nomeados 2, 17 e 20 (informação confidencial) como alvo da amplificação.

Tabela 2. Lotes de produção da M-MLV-RT CBIot com seus respectivos rendimentos e condições de cultivo e indução.

Lote	Rendimento	Meio de Cultura	Condição de indução
1 (09/20)	6 mg/L	LB	IPTG 1mM, 20°C, <i>overnight</i>
2 (12/20)	9 mg/L	SOB	IPTG 1mM, 20°C, <i>overnight</i>
3 (09/21)	9,36 mg/L	SOB	IPTG 1mM, 20°C, <i>overnight</i>
4 (10/21)	12 mg/L	SOB	3 adições de lactose 0,2%, 20°C, <i>overnight</i>

3.2 PmUreβ

3.2.1 Transformação de pET23a::*ureB* em *E. coli* Lemo21 (DE3) e seleção de clones

Linhagens de *E. coli* Lemo21 (DE3) termocompetentes armazenadas a -80 °C foram utilizadas para a transformação de pET23a::*ureB*. A transformação e a subsequente distribuição das suspensões em placas foram realizados de modo similar ao protocolo anteriormente descrito neste trabalho. Utilizou-se, porém, 2 µL do plasmídeo pET23a::*ureB* (400 ng) e para a placa de LB-ágar, ampicilina a 100 µg/mL e cloranfenicol a 40 µg/mL. Cinco das colônias transformadas foram inoculadas em meio LB contendo os devidos

antibióticos, sendo uma fração destes pré-inóculos aliqüotados e armazenados com 20% de glicerol a -80 °C e a outra utilizada para o teste de seleção de clones.

A seleção de clones também foi realizada de maneira similar àquela descrita anteriormente para *E. coli* Lemo21 (3.1.2), com adição de ramnose a 0,4 mM para a indução. Após incubação *overnight*, as culturas foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 min a 4° C e a lise foi realizada como descrito anteriormente (3.1.2). A presença de proteínas induzidas foi avaliada por SDS-PAGE (GALLAGHER, 2012) na concentração de 15%, seguida de *Western Blot* com o anticorpo monoclonal anti-His-tag 1:2.000 (Sigma-Aldrich). A seleção dos clones bacterianos positivos foi baseada na amostra com a banda mais intensa em 13 kDa.

3.2.2 Expressão induzível e purificação de PmUreß em escala laboratorial

Dois frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 250 mL de meio LB foram utilizados para o cultivo nas condições de indução previamente descritas (3.2.1). O meio de cultivo foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min a 4 °C e o *pellet* foi ressuscitado em tampão Tris-HCl (Tris a 20 mM, NaCl a 500 mM, pH 7,5) contendo imidazol a 5 mM. As células foram lisadas por ultrassonicação de ponta e centrifugadas a 14.000 x g por 40 min. O extrato proteico bruto foi submetido à cromatografia de afinidade em matriz *Chelating Sepharose* e subsequentemente lavado com tampão Tris-HCl e quantidades crescentes de imidazol (5, 80 e 500 mM). A diálise foi realizada *overnight* em tampão de estoque Tris-HCl (10 mM, pH 7,5) e DTT (1 mM). Esta solução foi então esterilizada por ultrafiltração em filtro de náilon com poros de 0,22 µm para os ensaios com as bactérias. O método Bradford (BRADFORD, 1976) foi empregado para a quantificação proteica e a pureza foi avaliada por SDS-PAGE seguida de *Western Blot*. As amostras foram armazenadas a 4 °C.

3.2.3 Ensaio antibacteriano

As células de *S. aureus* (gentilmente cedidas pela Profa. Livia Kmetzsch Rosa e Silva, Centro de Biotecnologia, UFRGS) e de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram isoladas por esgotamento em placas de Petri contendo ágar-LB e incubadas *overnight* a 37° C. Estes

isolados foram cultivados em 5 mL de meio LB *overnight* e, após, tiveram a sua concentração ajustada para a $OD_{600nm} = 0,08$ a $0,1$ ($0,5$ na escala McFarland) em Nanodrop a 600 nm.

Em microplaca de 96 poços, foram adicionadas, em triplicatas, 50 μ L das células junto a 50 μ L de crescentes concentrações de PmUre β em tampão de estocagem ($0,56$, $1,125$, $2,25$ e $4,5$ μ M). Como controle positivo, foi utilizada ampicilina (20 μ g) e, como controle negativo, foi utilizado o tampão de estoque. Após 24 h de incubação a 37 °C em estufa bacteriológica, para cada amostra foram realizadas diluições seriadas até 10^{-8} em solução salina ($0,9$ % NaCl) e plaqueadas pelo método de *Drop plate* em LB-ágar. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado pela contagem de colônias, multiplicado pela diluição na qual foi possível realizar a quantificação e multiplicado pelo volume total (200 μ L), para considerar o volume de 1 mL, já que foram utilizados 5 μ L da diluição no ensaio. Este ensaio foi adaptado daquele descrito por MARTINELLI et al. (2017).

A análise estatística dos dados gerados foi realizada no *software* GraphPad Prism v9 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) utilizando ANOVA de uma via e teste de múltiplas comparações Kruskal-Wallis para distribuições não paramétricas. Considerou-se significância estatística de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação pET23a::*M-MLV-RT* em *E. coli* DH5 α e Sequenciamento do Plasmídeo

Duas transformações com o plasmídeo comercial purificado pET23a::*M-MLV-RT* em *E. coli* DH5 α foram realizadas com a finalidade de multiplicação e extração do plasmídeo. Porém, não foram obtidas colônias transformantes. Desse modo, foi realizada a extração de plasmídeos a partir de células *E. coli* DH5 α ::pET23a::*M-MLV-RT* anteriormente estocadas a -80 °C. Foi realizado o sequenciamento de DNA a fim de verificar a integridade do plasmídeo e a presença da inserção da sequência codificante da *M-MLV-RT* após a estocagem. O resultado do sequenciamento apresentou identidade de 92% para a *M-MLV-RT* (N_P955591.1, Figura 1), confirmando a integridade do plasmídeo. A região 3'-terminal do

alinhamento apresentou identidade relativa menor por conta da baixa qualidade dos picos finais do eletroferograma.

p80 RT [Moloney murine leukemia virus]

Sequence ID: [NP_955591.1](#) Length: 671 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 278 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
497 bits(1279)	3e-175	Compositional matrix adjust.	256/278(92%)	258/278(92%)	0/278(0%)	+1
Query 106		LNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPKATSTPVSI				285
Sbjct 1		LNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPKATSTPVSI				60
Query 286		KQYPMSQEARLGIKPHIQRLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKR				465
Sbjct 61		KQYPMSQEARLGIKPHIQRLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKR				120
Query 466		VEDIHPTVNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDFAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISG				645
Sbjct 121		VEDIHPTVNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDFAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISG				180
Query 646		QLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTR				825
Sbjct 181		QLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTR				240
Query 826		ALLQTWATWLSREREKSAXLPETGENIWGILLKXSQRW 939				
Sbjct 241		ALLQT R K A + + GYLLK QRW 278				

Figura 1. Alinhamento da sequência peptídica deduzida do resultado do sequenciamento de pET23a::M-MLV-RT frente à sequência conhecida da M-MLV-RT utilizando BLASTx.

4.2 Transformações de pET23a::M-MLV-RT em *E. coli* BL21(DE3) pTGroE e Seleção de Clones

A primeira colônia recuperada de transformação de *E. coli* BL21(DE3) pTGroE foi obtida no experimento número 6. Diferente das transformações anteriores, não foi realizada centrifugação para concentração de células e utilizou-se 1.688 ng de um plasmídeo estocado em -20°C, como é possível observar na Tabela 1.

A transformação número 7 permitiu a produção de uma placa com mais de 15 colônias. Foram utilizados 2.510 ng do plasmídeo 4 e as células foram recuperadas em meio LB. O clone 1 da transformação 6 (clone 1-6) foi o que resultou em maior banda relativa à M-MLV-RT pela análise por SDS-PAGE (Figura 2), sendo também visível no resultado de *Dot-Blot*. Os demais clones da transformação do experimento 7 não apresentaram banda na altura do controle positivo diferenciável. O clone 1-6 foi, então, induzido à expressão e a proteína

foi posteriormente purificada, obtendo-se um rendimento muito baixo de 0,23 mg/L, após concentração.

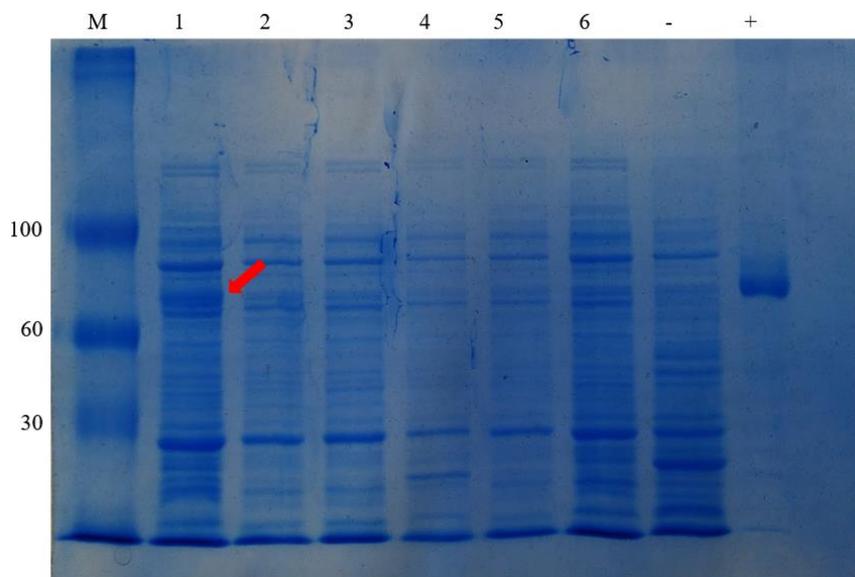


Figura 2. Seleção de clones da transformação número 7. Resultado de análise por SDS-PAGE demonstrando a presença de proteínas derivadas de clones de pET23a::*M-MLV-RT* em *E. coli* BL21(DE3) pTGroE após a indução com IPTG. -: Clone não induzido; +: M-MLV-RT purificada; M: Marcador *ColorBurst* (Sigma-Aldrich).

Na transformação resultante do experimento número 9, repetiram-se as condições da transformação 7, novamente utilizando 2.510 ng do plasmídeo 4. Consistentemente, esta resultou em colônias transformantes, mas não foi detectada a presença de proteína recombinante em quaisquer dos clones testados.

Foram obtidas três colônias a partir da recuperação de transformantes na condição número 12. Utilizou-se o plasmídeo 5, purificado a partir de um antigo clone de *E. coli* DH5α::pET23a::*M-MLV-RT*. O clone 2 da transformação número 12 (2-12) apresentou a banda mais intensa no SDS-PAGE (Figura 3), além de apresentar um resultado positivo no experimento de *Dot Blot* (imagem não disponível). Este clone será utilizado para realizar uma nova produção de proteínas em 1 L de cultivo, para o preparo de um novo lote da enzima.

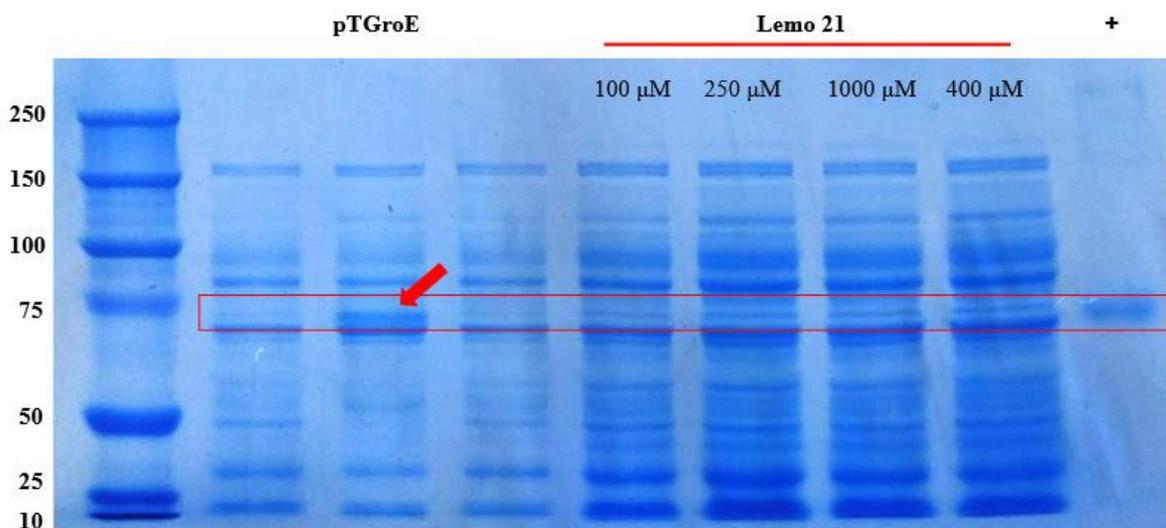


Figura 3: Seleção de clones da transformação número 12 e curva de ramnose. Resultado da análise de SDS-PAGE realizado a partir de 3 clones transformados de *E. coli* BL21(DE3) pTGroE pET23a::*M-MLV-RT* após indução com IPTG e curva de ramnose de clone transformado de *E. coli* Lemo21; +: M-MLV-RT purificada; M: Marcador molecular *BioRad Precision Plus Protein Dual Color*.

A dificuldade da transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3) pTGroE com pET23a::*M-MLV-RT* foi constante desde as primeiras tentativas pelo grupo de pesquisa. Somado a isso, mesmo obtendo clones capazes de gerar um rendimento alto de proteína recombinante (Tabela 2), foi observado que, após o estoque destes clones, as produções seguintes obtiveram rendimentos reduzidos. Desse modo, a transformação foi definida como o maior gargalo da produção de M-MLV-RT recombinante.

Desse modo, buscou-se testar diferentes parâmetros para a transformação (Tabela 1). Aparentemente, a eficiência de transformação foi afetada pelo aumento da quantidade de plasmídeo, especialmente quando acima de 2.500 ng, como observado nas transformações 7 e 9. Contudo, essas transformações não resultaram em clones com expressão satisfatória. Considerando que a maioria dos protocolos comerciais sugerem o uso de baixas quantidades de plasmídeo para a transformação, com o máximo de 100 ng de DNA por 50 μ L de células termocompetentes, é possível que o uso excessivo de DNA tenha comprometido a capacidade destes clones de produzir a proteína recombinante. Levando em consideração que os lotes produzidos anteriormente utilizaram concentrações de 800 ng de plasmídeo por 200 μ L de células, é sugerido voltar a usar estas concentrações e buscar melhorar a eficiência de transformação por outros parâmetros. Anteriormente a este trabalho, já foram testadas

concentrações mais baixas de plasmídeo utilizando método de eletroporação sem, no entanto, maior sucesso.

Ao passo que a adição de glicose e o uso de meio LB ou SOB não aparentam ter influenciado na eficiência de transformação, é possível que a ausência de centrifugação e a utilização de plasmídeo estocado em -20 °C tenham influenciado, uma vez que todas as transformações de sucesso deram-se nessas condições. Quanto ao tempo de choque térmico utilizado, este foi prevalentemente de 2 min, com exceção de um teste em que se utilizou 45 s e que não resultou em transformantes. É possível, porém, que o tempo maior esteja reduzindo a eficiência de transformação já baixa e dificultando a obtenção de colônias transformadas, uma vez que, para a maioria das linhagens de *E. coli*, é sugerido que se execute o choque térmico por 25 a 45 s (FROGER; HALL, 2007). Desse modo, sugere-se o uso de menores tempos de choque térmico para as próximas transformações.

Ademais, também foi testada a transformação e a expressão com bactérias *E. coli* Lemo21. Utilizando 800 ng do plasmídeo 6, foram obtidas 3 colônias. Uma destas foi induzida à expressão a fim de se testar o efeito da adição de diferentes concentrações de ramnose, mas todas apresentaram banda de intensidade similar (Figura 3). Como a expressão mostrou-se aquém da apresentada pelo clone 2 de *E. coli* BL21(DE3) pTGroE, os clones de *E. coli* Lemo21 não foram utilizados para ensaios posteriores.

4.3 Atividade M-MLV-RT em RT-qPCR

O teste da atividade da M-MLV-RT CBIot em comparação às enzimas comerciais Sigma, Qiagen e iScript está apresentado na Tabela 3. Dentre as enzimas comerciais, iScript apresentou os menores valores de Ct (*Threshold Cycle*) para os *primers* testados. As enzimas Sigma e Qiagen apresentaram valores próximos, com exceção da amplificação do *primer* 20 pela enzima Sigma (duplicatas com valor de Ct de 39,67 e 36,51). Comparativamente, a M-MLV-RT CBIot obteve atividade satisfatória com o tempo de incubação de 30 min, similar à atividade apresentada pelas enzimas comerciais e até com menores valores de Ct quando comparado à M-MLV-RT da Qiagen (Figura 4).

Tabela 3: Comparação da eficiência de enzimas M-MMLV-RT. As enzimas comerciais Qiagen, Sigma e iScript, assim como as M-MLV-RT CBIOT com 15 min, 30 min e 1 h de incubação, foram comparadas quanto ao seu *Threshold Cycle* (Ct). Foram testados *primers* para os genes 2, 17 e 20.

	<i>Primer</i>	<i>Threshold Cycle</i> (Ct) (Rep 1)	<i>Threshold Cycle</i> (Ct) (Rep 2)
QIAGEN	2	25,49	23,17
	17	30,26	
	20	33,32	31,18
SIGMA	2	25,6	31,02
	17	29,97	30,62
	20	39,67	36,51
ISCRIPIT	2	22,12	22,35
	17	25,47	26
	20	27	25
CBIOT 15 min	2	40,35	10,97
	17	29,51	28,06
	20	9,99	28,34
CBIOT 30 min	2	22,88	24,36
	17	27,68	25,79
	20	28,9	29
CBIOT 1 h	2	25,04	29,03
	17	27,46	37,95
	20	29,37	28,56

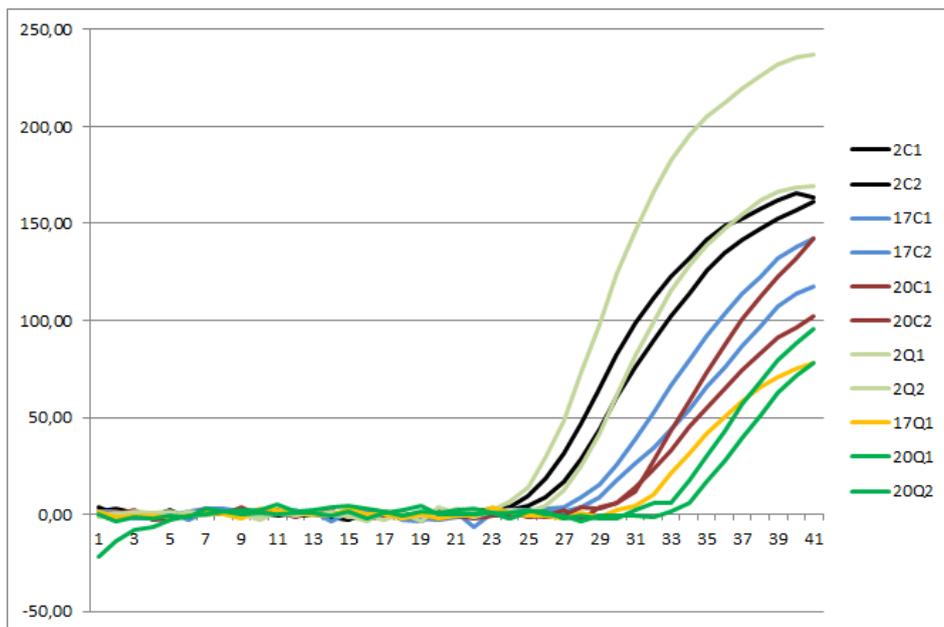


Figura 4. Comparação das atividades de M-MLV-RT CBiot (15 min de incubação) e Qiagen. Curva de amplificação por RT-qPCR onde cada linha corresponde a um gene (2, 17 ou 20) amplificado em uma condição (C ou Q, CBiot ou Qiagen) em duplicata (1 ou 2).

É relevante mencionar que a enzima M-MLV-RT CBiot do lote 4 (Tabela 2) foi produzida em outubro de 2021, cerca de seis meses antes deste teste de atividade, demonstrando a capacidade da enzima de se manter estável e ativa na estocagem em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por pelo menos seis meses.

4.4 Expressão de PmUreβ

A expressão de PmUreβ foi confirmada pelos resultados de SDS-PAGE e de *Western Blot* a partir de amostra purificada (Figura 6).

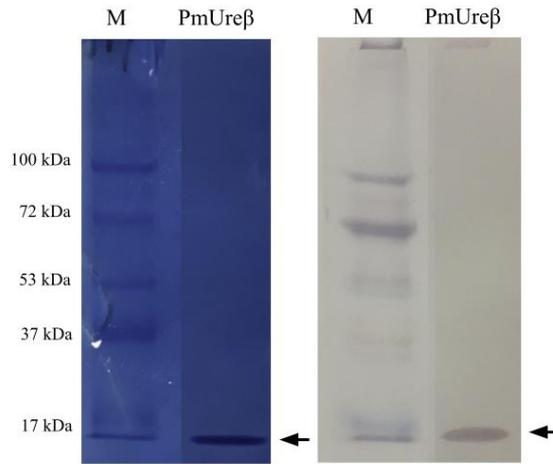


Fig. 6. Confirmação da purificação de PmUreβ. Ensaios de SDS-PAGE e *Western Blot* confirmam a presença de banda na altura de 13 kDa. M: Marcador *ColorBurst* (Sigma-Aldrich).

4.5 Ensaios antibacterianos

P. aeruginosa não teve sua multiplicação inibida por PmUreβ, ao menos nas concentrações testadas neste trabalho. Apenas a concentração de 0,56 μM apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo ($P < 0,0001$). Contudo, nesta concentração, houve um aumento das UFC/mL. Este resultado sugere uma indução da multiplicação bacteriana em função das baixas concentrações de PmUreβ. Além disso, o controle negativo apresentou menor crescimento ou crescimento igual às maiores concentrações testadas, evidenciando que pode ter ocorrido uma certa toxicidade relacionada ao tampão. Provavelmente, o agente redutor DTT pode ter levado a uma certa toxicidade às bactérias. Uma alternativa aos próximos experimentos será o uso de um controle negativo apenas com solução salina para checar o efeito sobre o crescimento bacteriano.

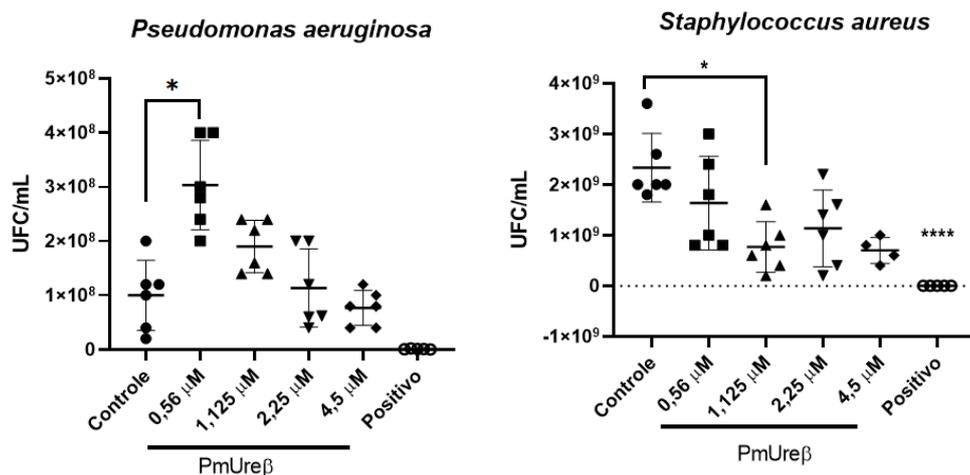


Fig. 7. Atividade antimicrobiana de PmUreβ. (a) *Pseudomonas aeruginosa*; (b) *Staphylococcus aureus*. Os gráficos representam o número de UFC por mL de suspensão bacteriana, demonstrando-se a distribuição dos pontos e a média \pm DP, n = 6. Análise estatística realizada no software *GraphPad Prism v9*, utilizando ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações Kruskal-Wallis. * representa diferença estatística ($p < 0.05$), **** representa diferença estatística ($p < 0.0001$).

S. aureus apresentou diferença estatística na concentração de 1,125 μM ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo. Esta concentração do peptídeo resultou na inibição da multiplicação bacteriana. Nas outras concentrações, não foi observada inibição da formação de colônias.

Assim como a PmUreβ, Jaburetox (JBTX) é um peptídeo recombinante também proveniente de uma urease (JBU) de *C. ensiformis*. JBTX possui cerca de 11 kDa e apresenta efeitos tóxicos contra insetos e fungos. Este peptídeo, quando testado contra *E. coli* e *Bacillus cereus*, apresentou uma inibição de crescimento de 50% na concentração de 13,5 μM . Quando testado contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, JBTX apresentou redução do crescimento bacteriano a partir da concentração de 6,75 μM , com o menor crescimento na concentração de 13,5 μM (BECKER-RITT; PORTUGAL; CARLINI, 2018). Neste trabalho, não utilizamos doses maiores nos testes devido a limitações de concentrações proteicas obtidas ao longo da produção de PmUreβ.

Comparativamente, PmUreβ demonstrou capacidade de inibir o crescimento bacteriano de *S. aureus* em concentração mais baixa, de 1,125 μM . Embora não se tenha demonstrado inibição em concentrações maiores, estes resultados podem ter ocorrido devido a

limitações estatísticas, sendo necessário repetir os experimentos com um maior número de amostras, além de testar concentrações maiores do peptídeo. Por outro lado, o fato de *P. aeruginosa* ter apresentado uma redução de crescimento apenas na presença de 6,75 μM de JBTX, nos indica que são necessários testes em maiores concentrações de PmUre β para aferir sua possível atividade antibacteriana contra esta bactéria.

O fato de se haver encontrado atividade antibacteriana para *S. aureus*, mas não para *P. aeruginosa*, pode também ser devido ao fato da segunda ser uma bactéria Gram-negativa, naturalmente mais resistente a compostos antimicrobianos (EPAND *et al.*, 2016). A maior suscetibilidade de bactérias Gram-positivas a um peptídeo antimicrobiano já foi reportada na literatura. Em um experimento utilizando os peptídeos Melimine, Mel4 e RK758 aderidos a uma superfície de vidro com o uso de polidopamina e em concentração de 4 mg/mL, foi observada uma erradicação total de *S. aureus* com o uso de qualquer um dos peptídeos, enquanto houve apenas uma redução de crescimento da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* (BROWNE *et al.*, 2022).

A maioria dos peptídeos com ação antibacteriana de uso comercial aprovado são da classe dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) (YAN *et al.*, 2021). Estes são pequenos peptídeos, com cerca de 11 a 50 aminoácidos, que fazem parte do sistema imune inato do organismo que o produz. Estes são especialmente relevantes devido ao seu mecanismo de ação, direcionado principalmente à membrana microbiana, o que dificulta o desenvolvimento de resistência microbiana contra eles (BROGDEN, 2005). De modo semelhante, mesmo que não se conheça completamente o mecanismo de ação das atividades biológicas de JBTX, foi demonstrado que este peptídeo é capaz de interagir com vesículas lipídicas e bicamadas lipídicas (PIOVESAN *et al.*, 2014). É possível hipotetizar que PmUre β também possua um mecanismo de ação similar às AMPs e ao JBTX.

Considerando que não é evolutivamente favorável para um organismo produzir um composto que apresente toxicidade contra ele próprio, é possível hipotetizar que este organismo não apresenta suscetibilidade para o determinado composto; ou só é tornado tóxico de acordo com um contexto. Um mecanismo possível para o desenvolvimento da toxicidade seria a formação de peptídeos crípticos a partir de PmUre β . Peptídeos crípticos são clivados por proteases a partir de proteínas precursoras, apresentando diferente atividade da original, ou atividade melhorada (UEKI *et al.*, 2007). Assim, conhecendo-se a funcionalidade da PmUre β no complexo proteico da PMU, o qual é principalmente estrutural, um criptídeo

oriundo dessas proteínas teria função diferente da original, possivelmente sendo o motivo da relatada atividade antimicrobiana. Esta seria uma possível explicação para o desenvolvimento de um mecanismo de toxicidade que poderia servir para aumentar o *fitness* de *P. mirabilis* contra os demais microrganismos em situações de competição, ao mesmo tempo em que não leva a toxicidade contra a própria célula.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

A transformação foi identificada como maior gargalo da produção de M-MLV-RT e os parâmetros testados, assim como o uso de diferentes linhagens para a expressão (*E. coli* BL21(DE3) pTGroE e Lemo21), não foram suficientes para melhorar a eficiência da transformação. No futuro, sugere-se o uso de menores tempos para o choque térmico além de concentrações de no máximo 800 ng de plasmídeo para 200 uL de células. Também é possível avaliar novamente a eficiência de transformação a partir de eletroporação e explorar diferentes linhagens de *E. coli* para a transformação e produção de M-MLV-RT.

Quanto à atividade enzimática testada, a M-MLV-RT CBIOT se mostrou satisfatória em comparação com enzimas comerciais (Qiagen, Sigma e iScript), especialmente com o tempo de incubação de 30 min. Este experimento demonstrou a capacidade da enzima em se manter estável e ativa na estocagem em -20 °C por pelo menos seis meses. É pretendido testar a atividade em maiores períodos de tempo a fim de determinar a estabilidade da enzima após maiores tempos de estocagem.

Quanto à PmUreβ, a segunda proteína produzida neste trabalho, não se observou inibição sobre *P. aeruginosa* nas concentrações testadas, mas se obteve redução da multiplicação de *S. aureus* para a concentração de 1,125 μM (P<0,05). Mais estudos serão necessários para estudar o potencial antibacteriano de PmUreβ, principalmente testando a sua atividade contra diferentes bactérias e em maiores concentrações.

BIBLIOGRAFIA

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE IN EUROPE 2022 - 2020 DATA. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>. Acesso em: 10 abr. 2022.
- ARMBRUSTER, C.; MOBLEY, H. Merging mythology and morphology: The multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 743–754, 2012.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019.
- BAHASHWAN, S. A.; SHAFEY, H. M. E. ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS OF *PROTEUS* ISOLATES FROM CLINICAL SPECIMENS. **European Scientific Journal, ESJ**, [s. l.], v. 9, n. 27, 2013. Disponível em: <https://eujournal.org/index.php/esj/article/view/1819>. Acesso em: 12 abr. 2022.
- BECKER-RITT, A. B.; CARLINI, C. R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. **Peptide Science**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 367–384, 2012.
- BECKER-RITT, A. B.; PORTUGAL, C. S.; CARLINI, C. R. Jaburetox: update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 23, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/vatitd/a/cSzMsZdjgkyGWRnPGkPBfsf/?format=html&lang=en>. Acesso em: 20 abr. 2022.
- BLAKELEY, R. L. *et al.* Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. **Biochemistry**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1991–2000, 1969.
- BOTÃO, G.; FERRAZ, K.; SERVILHA, M. Uma vulnerabilidade evidente: por que nossa saúde depende tanto de importações? Em: OBSERVATÓRIO DE POLÍTICA EXTERNA E DA INSERÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL. 20 set. 2021. Disponível em: <https://opeb.org/2021/09/20/uma-vulnerabilidade-evidente-por-que-nossa-saude-depende-tanto-de-importacoes/>. Acesso em: 15 maio 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- BROLL, V. *et al.* Non-enzymatic properties of *Proteus mirabilis* urease subunits. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 110, p. 263–274, 2021.
- BROWN, A. F. *et al.* *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 4, p. 507, 2014.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.
- CHAMPOUX, J. J.; SCHULTZ, S. J. Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 276, n. 6, p. 1506–1516, 2009.

- CHEN, Y.; XU, W.; SUN, Q. A novel and simple method for high-level production of reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 1051–1057, 2009.
- COKER, C. *et al.* Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 1497–1505, 2000.
- DATTELBAUM, J. D. *et al.* UreR, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 1026–1030, 2003.
- EPAND, R. M. *et al.* Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1858, n. 5, Antimicrobial peptides, cell membrane and microbial surface interaction, p. 980–987, 2016.
- FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 18–28, 2008.
- FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, [s. l.], n. 6, p. e253, 2007.
- GALLAGHER, S. R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, [s. l.], v. Chapter 10, p. Unit 10.1.1-44, 2012.
- GIBBS, K. A.; GREENBERG, E. P. Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression. **Chemical reviews**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 188–194, 2011.
- GUBLER, U.; HOFFMAN, B. J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. **Gene**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 263–269, 1983.
- HAMOUDI, A. C.; PALMER, R. N.; KING, T. L. Nafcillin resistant *Staphylococcus aureus*: a possible community origin. **Infection control: IC**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 153–157, 1983.
- HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.
- HLA, T.; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 89, n. 16, p. 7384–7388, 1992.
- HUMMON, A. B. *et al.* Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. **BioTechniques**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 467–470, 472, 2007.
- JACOBSEN, S. M. *et al.* Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 26–59, 2008.
- JONES, B. D.; MOBLEY, H. L. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 2198–2203, 1987.
- KOTEWICZ, M. L. *et al.* Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. **Gene**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 249–258, 1985.
- LANDGRAF, W.; SANDOW, J. Recombinant Human Insulins – Clinical Efficacy and Safety in Diabetes Therapy. **European Endocrinology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 12–17, 2016.

- LIBUS, J.; STORCHOVÁ, H. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. **BioTechniques**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 156, 158, 160 passim, 2006.
- LIGABUE-BRAUN, R. *et al.* 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases. **Naturwissenschaften**, [s. l.], v. 100, n. 5, p. 459–467, 2013.
- LOWE, R. *et al.* Transcriptomics technologies. **PLoS computational biology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. e1005457, 2017.
- LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.
- MANOS, J.; BELAS, R. The Genera Proteus , Providencia , and Morganella. *Em: PROKARYOTES*. [S. l.: s. n.], 2006. v. 6, p. 245–269.
- MOBLEY, H. L.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.
- MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 451–480, 1995.
- MOHR, S. *et al.* Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing. **RNA**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 958–970, 2013.
- OKELLO, J. B. A. *et al.* Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA. **PloS One**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. e13931, 2010.
- OLIVERA-SEVERO, D.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria?. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 39, p. 851–861, 2006.
- ORTIZ, R. M.; LOBATO, A. O. C. THE INNOVATION AND PROTECTION OF INTELLECTUAL PROPERTY IN BRAZIL: ANALYSIS OF THE NATIONAL DEPENDENCE OF FOREIGN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY. **Revista Gestão Inovação e Tecnologias**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <http://www.revistageintec.net/index.php/revista/article/view/1315>. Acesso em: 15 maio 2022.
- OSCORBIN, I. P.; FILIPENKO, M. L. M-MuLV reverse transcriptase: Selected properties and improved mutants. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 19, p. 6315, 2021.
- PIOVESAN, A. R. *et al.* Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.006>. Acesso em: 20 abr. 2022.
- POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, [s. l.], v. 24, n. 11, Antimicrobial Peptides II, p. 1681–1691, 2003.
- QUIANZON, C. C.; CHEIKH, I. History of insulin. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 10.3402/jchimp.v2i2.18701, 2012.
- RIEG, S. *et al.* Resistance against antimicrobial peptides is independent of Escherichia coli AcrAB, Pseudomonas aeruginosa MexAB and Staphylococcus aureus NorA efflux pumps. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 174–176, 2009.

ROTH, M. J.; TANESE, N.; GOFF, S. P. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 260, n. 16, p. 9326–9335, 1985.

RÓZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 65–89, 1997.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, p. 2475067, 2016.

SANTOS, A. L. dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 43, p. 413–423, 2007.

SCHMIDTCHEN, A. *et al.* Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 157–168, 2002.

SUMNER, J. B. THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 435–441, 1926.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus*. *Em: STATPEARLS*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. *E-book*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>. Acesso em: 3 abr. 2022.

TELESNITSKY, A.; GOFF, S. P. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. *Em: COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (org.). Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. *E-book*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19383/>. Acesso em: 31 jan. 2022.

UEKI, N. *et al.* Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. **Biopolymers**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 190–198, 2007.

WANG, G. Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 728–758, 2013.

YAN, Y. *et al.* Advances of peptides for antibacterial applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 202, p. 111682, 2021.