



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA DE VEICULAÇÃO E
EXPRESSÃO DE DNazimas PARA *Escherichia coli*: UM
PROTÓTIPO PARA A FAGOTERAPIA**



HUGO VALÉRIO CORRÊA DE OLIVEIRA



**MANAUS-AM
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

HUGO VALÉRIO CORRÊA DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA DE VEICULAÇÃO E
EXPRESSÃO DE DNazimas PARA *Escherichia coli*: UM
PROTÓTIPO PARA A FAGOTERAPIA**

**Tese Apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal
do Amazonas, como Parte dos
Requisitos para a Obtenção do Título
de Doutor em Biotecnologia, Área de
Concentração: “Biotecnologias para a
Saúde”.**

Orientador: Edmar Vaz de Andrade, Dr.

**MANAUS-AM
2013**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Hugo Valério Corrêa de
O48c Construção de um sistema de veiculação e expressão de
DNAzimas para Escherichia coli: um protótipo para a fagoterapia. /
Hugo Valério Corrêa de Oliveira. 2013
208 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Edmar Vaz de Andrade
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. DNAzimas 10-23. 2. Expressão DNAzimas. 3. Transfecção. 4.
Escherichia coli. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

HUGO VALÉRIO CORRÊA DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA DE VEICULAÇÃO E EXPRESSÃO DE
DNazimas PARA *Escherichia coli*: UM PROTÓTIPO PARA A FAGOTERAPIA**

Tese Apresentada ao Programa Multi-Institucional
de Pós-Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal do Amazonas, como Parte dos
Requisitos para a Obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia, Área de Concentração:
“Biotecnologias para a Saúde”.

DEFESA DE TESE EM: 09 / 08 / 2013

BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

Dr. Edmar Vaz de Andrade
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Universidade de Brasília - UNB

Dr. Adolfo José da Mota
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dr. Luis André Morais Mariúba
Instituto Leônidas e Maria Deane / Fundação Oswaldo Cruz – IMLD/FIOCRUZ

Dr. Spartaco Astolfi Filho
Universidade Federal do Amazonas

Suplentes:

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio-
Centro de Biotecnologia do Amazonas

Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Izaura Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Imensamente à minha família, papai (José Armínio), mamãe (Izaura Lúcia), irmãos (Sílvia, Anderson, Igor) e sobrinha (Agnes), por terem me apoiado e proporcionado alegrias durante todos os momentos de dificuldade. Vocês são tudo pra mim!

Ao meu orientador e amigo, Edmar, por ter me acolhido, instruído, e “segurado a barra” quando tudo quase chegou ao descalabro, inclusive quando fomos surpreendidos com o descomprometimento e irresponsabilidade de quem não esperávamos tal atitude. Obrigado por creditar confiança em meu projeto. Obrigado por tudo, chefe!

Aos colegas que conheci no laboratório e que se tornaram amigos para uma vida toda: Helber (Mococa), Edson (Negão), Rogério (Oliveira), Ítalo (Professor), Tiago (Santoli), Élson (Sadalla). A verdadeira amizade é eterna e sincera! Espero que no paraíso haja um lugar parecido com o “Buteco de Minas”, onde sempre possamos nos reunir e falar da vida!

Ao prof. Dr. José Odair Pereira, pelo auxílio financeiro no início do projeto, sem esperar nada em troca. O Sr. é um exemplo de profissional, professor. Muito Obrigado!

Ao prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho pelo auxílio financeiro no decorrer de todo o projeto, pela disponibilidade e confiança depositada em mim. O Sr. é uma lenda viva da biotecnologia em nosso país. Que o Sr. sempre sirva de inspiração para muita gente!

Aos funcionários da PPGBIOTEC/UFAM: Nubiane, Roberto Lira, Josué e Elzimar, pela prestatividade.

Aos colegas de laboratório: Mirna, Eneidina (Dina), Nyanne, Lanna, Andréa (Listik), Anita, Diego (Barreto), P. H (Sausmikát), Bruna, Jonathan, Maurício, Júlio (Nino), Eliane, Suelem, Marcelo e Renan pela convivência, sempre muito animada, durante todo este tempo. Grande abraço, também, para a auxiliar de serviços gerais mais fofa do mundo, a simpatia personificada, que atende por dona Regina.

A toda a minha família, paterna e materna, em especial, tia Isa, tio Carlos e tia Rosa. Vocês sempre terão todo o meu carinho e consideração (...) vó Lila, vó Ana e vô Alberto, um abraço a todos vocês, onde estiverem... obrigado por terem feito parte da minha vida. Vô Armínio, apesar de não o ter conhecido, deixo um grande abraço ao Sr. também.

À querida Fernanda (cara de tatu) pelo companheirismo nos dois últimos anos deste período.

Ao Grande Arquiteto do Universo (G.A.D.U) por ter me proporcionado a honra de contemplar toda a beleza esplendorosa e perfeccionista deste mundo. Eu sou imensamente grato por isso!

EPIGRAFE

**“Se alguém quer ser o primeiro, seja o último de todos e o servo de todos”
(Jesus Cristo – Marcos 9:35)**

“Living is easy with eyes closed, misunderstanding all you see.
(...) Always, no sometimes, think it's me, but you know I know when it's a dream.
I think I know I mean a 'Yes' but it's all wrong, that is I think I disagree.”

(*Strawberry Fields Forever* - John Lennon (1967))

RESUMO

Os oligonucleotídeos antissenso apresentam grande potencial para serem utilizados como agentes terapêuticos. As DNAzimas 10-23 são as moléculas antissenso com maior estabilidade química e eficiência catalítica. Neste trabalho foi desenvolvido um sistema para a expressão de DNAzimas regulado por dois promotores, construído dentro de um fagomídeo que foi denominado pDESCP. A expressão da enzima MoMuLV-RT ocorre de forma constitutiva, por meio do promotor pA1. O segundo cassete, regulado pelo promotor *lac*, expressa um transcrito de RNA que originará a DNAzima. MoMuLV-RT atuará sobre o substrato de RNA, produzindo DNAzimas por meio da transcrição reversa. A DNAzima *ftsZ*, utilizada para validar esse sistema, foi eficientemente expressa e capaz de alterar a morfologia de *Escherichia coli*, que passou da forma bacilar para a filamentosa. Quando devidamente encapsidado pelo fago M13, pDESCP foi utilizado para transfectar diferentes linhagens *E. coli* F⁺. Ensaios cinéticos *in vitro* envolvendo DNAzimas com alvo sobre os transcritos dos genes de alanina racemase de *E. coli*, *alr* e *dadX*, não demonstraram resultados conclusivos. Isto impossibilitou que estas fossem testadas no fagomídeo. A veiculação de pDESCP para *E. coli* F⁺ e a possibilidade de inserção de novas DNAzimas em sua estrutura transformam este fagomídeo em um importante protótipo para a fagoterapia. Na condição de que DNAzimas letais sejam desenvolvidas contra *E. coli*, estas podem ser inseridas em pDESCP e transformá-lo em uma poderosa ferramenta capaz de impedir a transmissão de genes de patogenicidade, a partir de bactérias conjugativas.

Palavras-chave: DNAzimas 10-23; expressão DNAzimas; transfecção; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Antisense oligonucleotides have great potential for use as therapeutic agents. The DNAzymes 10-23 are antisense molecules with improved chemical stability and catalytic efficiency. This work developed a system for DNAzymes expression regulated by two promoters built within a phagemid, which was called pDESCP. The expression of MoMuLV-RT enzyme occurs in a constitutively way through the pA1 promoter. The second cassette, regulated by the lac promoter, expresses an RNA transcript that will give origin at DNAzyme. MoMuLV-RT will act on the RNA substrate, and then DNAzymes are produced by reverse transcription. The DNAzyme *ftsZ*, used to validate this system, was efficiently expressed and able to change the morphology of *Escherichia coli*, which went from bacillary to filamentous form. When properly packaged by M13 phage, pDESCP was used to transfect different strains of *E. coli* F+. In vitro kinetic assays involving DNAzymes with target on transcripts of alanine racemase genes of *E. coli*, *alr e dadX*, showed no conclusive results. This made it impossible for these were tested on the phagemid. The forwarding of pDESCP for *E. coli* F+ and the possibility of inserting new DNAzymes in its structure make this phagemid an important prototype for phage therapy. Provided that lethal DNAzymes are developed against *E. coli*, these can be inserted into pDESCP and turn it into a powerful tool able to prevent the transmission of pathogenic genes from bacteria that transfer by conjugation

Keywords: DNAzymes 10-23; DNAzymes expression; transfection; *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Representação diagramática da estrutura secundária de um RNA. ----- | 29 |
| Figura 2. Mecanismo de ação dos AS-ODN. ----- | 31 |
| Figura 3. Esquema geral de silenciamento gênico por RNAi. ----- | 33 |
| Figura 4. DNAzimas com motivos 8-17 e 10-23. ----- | 37 |
| Figura 5. Representação esquemática da DNAzima 10-23 pareada a seu substrato. ----- | 41 |
| Figura 6. Rota cinética da DNAzima que cliva RNA. ----- | 42 |
| Figura 7. Sistema de expressão de DNAzimas de 1º geração.----- | 45 |
| Figura 8. Sistema de expressão de DNAzimas de 2º geração.----- | 47 |
| Figura 9. Sistema de expressão de DNAzimas desenvolvido para <i>E. coli</i> . ----- | 49 |
| Figura 10. DNAzimas projetadas em M13mp18. ----- | 51 |
| Figura 11. Ciclo de vida dos bacteriófagos. ----- | 55 |
| Figura 12. Estrutura do fago M13.----- | 64 |
| Figura 13 . Vetor pGEM®-T Easy.----- | 75 |
| Figura 14. Esquema linearizado do vetor pRT 30-2.----- | 75 |
| Figura 15. Vetor pUC19-plac-ftsZ. ----- | 76 |
| Figura 16. Cassete de expressão para a DNAzima <i>ftsZ</i> .----- | 78 |
| Figura 17. Análise da indução de pRT30-2.----- | 109 |
| Figura 18. Esquema estrutural do vetor pRT 30-2.----- | 110 |
| Figura 19. Digestão parcial em pRT 30-2. ----- | 110 |
| Figura 20. Confirmação da construção do vetor pRT 30-2/Dz-ftsZ.----- | 111 |
| Figura 21. Esquema geral de funcionamento do sistema de expressão da DNAzima <i>ftsZ</i> . -- | 112 |
| Figura 22. Análise de pRT 30-2/Dz-ftsZ em <i>E. coli</i> . ----- | 116 |
| Figura 23. Demonstração, <i>in silico</i> , do alvo da DNAzima <i>ftsZ</i> . ----- | 117 |
| Figura 24. Expressão da DNAzima <i>ftsZ</i> em <i>E. coli</i> DH5αF'Iq.----- | 120 |
| Figura 25. Amplificação de <i>Ori fl</i> .----- | 122 |
| Figura 26. Análise da construção de pDESCP. ----- | 124 |
| Figura 27. Estrutura básica da construção de pDESCP, linearizado.----- | 124 |
| Figura 28. Estrutura básica da construção de pDESCP, na forma de vetor fechado. ----- | 125 |
| Figura 29. Curva de crescimento.----- | 127 |
| Figura 30. Transfecção em <i>E. coli</i> . ----- | 129 |
| Figura 31. Projeções estruturais do transcrito do gene <i>alr</i> . ----- | 131 |
| Figura 32. Projeções estruturais do transcrito do gene <i>dadX</i> . ----- | 132 |
| Figura 33. Amplificação da ORF dos genes <i>alr</i> e <i>dadX</i> , de <i>E. coli</i> K12.----- | 136 |
| Figura 34. "Método 1", para a avaliação da funcionalidade das DNAzimas.----- | 137 |
| Figura 35. Ensaio para detecção de RNA em gel de poliacrilamida corado com brometo de etídeo. ----- | 137 |
| Figura 36. "Método 2", para a avaliação da funcionalidade das DNAzimas. ----- | 139 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Classificação filogenética dos fagos. ----- | 53 |
| Tabela 2. Alvos propostos para DNAzimas sobre os transcritos dos genes <i>alr</i> e <i>dadX</i> . ----- | 134 |
| Tabela 3. DNAzimas propostas. ----- | 134 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores usados em PCR. ----- | 77 |
| Quadro 2. DNAzimas utilizadas em ensaios cinéticos. ----- | 77 |
| Quadro 3. PCR com gradiente de temperatura. ----- | 93 |
| Quadro 4. PCR com gradiente de temperatura. ----- | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| AS-ODN | Oligodesoxinucleotídeo (ou Oligodesoxirribonucleotídeo) antissenso |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DESCP | Sistema de expressão de DNAsimas carregado por fago |
| Dz | DNAsima |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo trifosfatado |
| EDTA | Ácido etileno diamino tetracético |
| ExPEC | <i>E. coli</i> extra-intestinais patogênicas |
| FDA | <i>Food and drug administration</i> |
| g | Grama |
| h | Hora |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| IAP | Ilhas de alta patogenicidade |
| IgE | Imunoglobulinas do tipo E |
| IgG | Imunoglobulinas do tipo G |
| IgM | Imunoglobulinas do tipo M |
| Kb | Quilobases |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| mL | Mililitro |
| min | Minutos |
| MOPS | Ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| MoMULV-RT | enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia de ratos Moloney |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| pA1 | Promotor do fago 1 |
| PB | Pares de base |
| PBS | Sítio de ligação para o início de/a... |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pCMV | Promotor do vírus Citomegalovírus |

| | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------|
| Ph | Potencial hidrogeniônico |
| <i>plac</i> | Promotor do operon <i>lac</i> |
| pRSV | Promotor do vírus do sarcoma Rous |
| p/v | Peso por volume |
| q.p.s | Quantidade suficiente para |
| rpm | Rotações por minuto |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RT | Transcriptase reversa |
| tRNA | RNA transportador |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| ssDNA | DNA fita simples |
| TBE | Tris / Ácido bórico / EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris (hidroximetil) aminometano |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UFP | Unidade formadora de Placa |
| µg | Micrograma |
| v/v | Volume por volume |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| β | Beta (maiúscula B): é a segunda letra do alfabeto grego |
| Δ | Delta (minúscula δ): é a quarta letra do alfabeto grego |
| λ | lambda (maiúscula Λ): é a décima primeira letra do alfabeto grego |
| Φ | fi maiúscula (minúscula: ϕ): é a vigésima primeira letra do alfabeto grego |
| ϕ | fi minúscula (maiúscula: Φ): é a vigésima primeira letra do alfabeto grego |
| & | é um caracter ou símbolo usado para substituir a conjunção aditiva “e” |
| ΔG | Variação da energia livre de Gibbs |
| $^{\circ} C$ | Graus Celsius |
| % | Porcentagem |

SUMÁRIO



| | |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| DEDICATÓRIA | V |
| AGRADECIMENTOS | VI |
| EPÍGRAFE | VII |
| RESUMO | IX |
| ABSTRACT | X |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE TABELAS | XII |
| LISTA DE QUADROS | XIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XIV |
| LISTA DE SÍMBOLOS | XVI |
| SUMÁRIO | XVII |
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivo Geral | 25 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 25 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 26 |
| 3.1 Terapia de Oligonucleotídeos Antissenso..... | 27 |
| 3.2 Tecnologias de Terapia Antissenso | 28 |
| 3.3 Mecanismos de Ação dos Oligonucleotídeos Antissenso | 30 |
| 3.3.1 Oligodesoxinucleotídeos antissenso (AS-ODN)..... | 30 |
| 3.3.2 RNA de interferência (RNAi)..... | 31 |
| 3.3.3 Enzimas de ácidos nucleicos: Ribozimas e DNAzimas | 35 |
| 3.4 Modificações Químicas em Oligonucleotídeos Antissensos..... | 37 |
| 3.5 Farmacocinética dos Oligonucleotídeos Antissenso | 39 |
| 3.6 DNAzimas que Clivam RNA | 40 |
| 3.6.1 Mecanismo Cinético da DNAzima 10-23 | 42 |
| 3.6.2 Modificações químicas em DNAzimas 10-23 | 43 |
| 3.7 Sistemas de Expressão para DNAzimas | 44 |
| 3.7.1 Vetores de 1º geração para a expressão de DNAzimas | 44 |
| 3.7.2 Vetores de 2ª geração para expressão de DNAzimas | 46 |
| 3.7.3 Vetores de Expressão para DNAzimas em Procariotos..... | 47 |
| 3.8 Sistemas para Entrega de DNAzimas | 51 |
| 3.9 Bacteriófagos | 52 |
| 3.9.1 O ciclo de vida dos fagos | 54 |
| 3.9.2 Fagoterapia | 56 |
| 3.9.3 Farmacocinética de fagos | 59 |
| 3.9.4 Fago M13: estrutura e mecanismo de infecção | 63 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.10 Plasmídeo F, “Ilhas de Patogenicidade” em <i>E. coli</i> e Perspectivas do Fago M13 para a Fagoterapia | 66 |
| 4 MATERIAL | 70 |
| 4.1 Meios para Cultivo | 71 |
| 4.2 Antibióticos | 73 |
| 4.3 Linhagens Celulares | 73 |
| 4.4 Plasmídeos | 74 |
| 4.5 Fago Helper | 76 |
| 4.6 Oligonucleotídeos Iniciadores para PCR | 76 |
| 4.7 DNAzimas para Ensaio Cinéticos | 77 |
| 4.8 Cassete de Expressão de DNAzimas | 78 |
| 4.9 Enzimas | 79 |
| 4.9.1 Endonucleases de restrição | 79 |
| 4.9.2 Enzimas de polimerização de nucleotídeos | 79 |
| 4.9.3 Outras enzimas | 79 |
| 4.10 Marcadores Moleculares Padrões de Peso e Tamanho | 80 |
| 4.11 Testes Comerciais | 80 |
| 4.12 Soluções de Uso Geral | 81 |
| 4.13 Soluções Utilizadas em Ensaio Cinéticos com DNAzimas | 81 |
| 4.14 Soluções Usadas para Eletroforese em Géis de Agarose e Poliacrilamida | 82 |
| 4.14.1 Gel de agarose | 82 |
| 4.14.2 Gel de acrilamida para proteínas | 82 |
| 4.14.3 Gel de acrilamida para RNA | 83 |
| 5 MÉTODOS | 84 |
| 5.0 Estratégia Experimental | 85 |
| PARTE 1: | |
| CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA PARA EXPRESSÃO DE DNAZIMAS EM PLASMÍDEO | 86 |
| 5.1 Sistema Plasmidial para Expressão de DNAzimas | 87 |
| 5.1.1 Construção do cassete para a expressão de DNAzimas | 87 |
| 5.1.2 Vetor de expressão da transcriptase reversa: pRT 30-2 | 87 |
| 5.1.2.1 Extração de DNA plasmidial em pequena escala | 88 |
| 5.1.3 Ligação do cassete de expressão de DNAzimas ao vetor pRT30-2 | 88 |
| 5.1.4 Análise da Expressão de DNAzimas | 90 |
| PARTE 2: | |
| CONVERSÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE DNAZIMAS EM FAGOMÍDEO | 92 |
| 5.2 Conversão de pRT 30-2/Dz-ftsZ em Fagomídeo | 93 |
| 5.2.1 Isolamento da região <i>Ori fl</i> | 93 |
| 5.2.2 Ligação de <i>Ori fl</i> em pRT 30-2/Dz-ftsZ | 94 |
| 5.2.2.1 Confirmação da ligação do inserto ao vetor | 95 |
| 5.2.3 Análise da expressão de DNAzimas em pDESCP | 96 |
| 5.2.4 Curva de crescimento | 97 |
| PARTE 3: | |
| ENCAPSIDAMENTO DE pDESCP | 98 |
| 5.3 Produção de Partículas Virais do Fago M13 Contendo pDESCP | 99 |
| 5.3.1 Preparação do fago auxiliar VCSM13 | 99 |
| 5.3.2 Recuperação de pDESCP pelo fago auxiliar VCSM13 | 99 |
| 5.3.3 Transfecção em <i>E. coli</i> DH5 α F'Iq | 99 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.3.1 Extensão da transfecção a outras linhagens de <i>E. coli</i> | 100 |
| PARTE 4: | |
| DESENVOLVIMENTO DE DNAZIMA LETAL PARA E. COLI | 101 |
| 5.4 Projeção de DNAzimas com Alvos em Alanina Racemase | 102 |
| 5.4.1 Produção de substratos para as DNAzimas..... | 102 |
| 5.4.1.1 Isolamento e clonagem dos genes <i>alr</i> e <i>dadX</i> | 102 |
| 5.4.1.1.1 Construção dos vetores pGalr e pGdadX | 104 |
| 5.4.1.1.2 Análise da orientação dos insertos | 105 |
| 5.4.1.2 Transcrição <i>in vitro</i> | 105 |
| 5.4.2 Ensaio Cinético com as DNAzimas Propostas..... | 106 |
| 5.4.2.1 Cinética de único <i>turnover</i> | 106 |
| 5.4.2.2 Análise da eficiência de clivagem das DNAzimas | 107 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 108 |
| 6.1 Análise de pRT 30-2 | 109 |
| 6.2 Vetor de Expressão de DNAzimas | 111 |
| 6.3 Análise da Funcionalidade do Sistema de Expressão de DNAzima | 113 |
| 6.4 Fagomídeo pDESCP e sua Veiculação para <i>E. coli</i> | 122 |
| 6.4.1 Construção de pDESCP | 122 |
| 6.4.2 Curva de crescimento | 125 |
| 6.4.3 Encapsidamento pDESCP e Análise da transfecção | 128 |
| 6.5 DNAzimas Contra o Transcrito dos Genes <i>alr</i> e <i>dadX</i> | 130 |
| 6.5.1 DNAzimas propostas | 130 |
| 6.5.2 Análise das DNAzimas projetadas | 135 |
| 7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS | 142 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 144 |
| ANEXOS | 172 |
| APÊNDICES | 205 |

* * *



INTRODUÇÃO



Oligonucleotídeos antissensos são curtos segmentos de DNA ou RNA que apresentam a propriedade de inibir a tradução de um determinado transcrito gênico. Esta forma de silenciamento gênico atua por diferentes mecanismos, a depender do tipo de molécula antissenso envolvida. Existem três classes de antissensos: oligodesoxinucleotídeos antissenso (AS-ODN); RNAs de interferência (RNAi); e enzimas de ácidos nucleicos (DNAzimas e Ribozimas).

Os oligonucleotídeos antissenso apresentam grande potencial para serem utilizadas como agentes terapêuticos. O primeiro “fármaco antissenso” aprovado para uso no mercado foi o Vitravene®, que atua contra a retinite causada pelo citomegalovírus. Este fármaco foi aprovado pelo FDA (sigla do termo em inglês: *Food and Drug Administration* – órgão de regulamentação e controle de medicamentos e alimentos, dos Estados Unidos da América) em 1998. Os oligonucleotídeos antissenso estão sendo enquadrados dentro de uma nova e promissora área da terapêutica, baseada em ácidos nucleicos, conhecida por “farmacoterapia antissenso”. Atualmente muitos antissensos estão sendo investigados, assim como, por conseguinte, algumas indústrias farmacêuticas têm surgido (ou ganhado destaque), visando este mercado. Destas, a indústria Isis Pharmaceuticals (<http://www.isispharm.>) se destaca, por apresentar registrado um maior número de oligonucleotídeos com potencial terapêutico em diferentes estágios de estudo clínico (SINGH *et al*, 2011).

Os principais problemas atrelados ao uso terapêutico dos antissensos é que estes são alvos fáceis para as nucleases, são imunogênicos, além de carecerem de veículos apropriados que os direcionem a um tipo celular específico. Atualmente, muitos estudos se concentram em modificações químicas na estrutura das diferentes classes de antissensos, com a finalidade de torná-los mais estáveis e, portanto, aumentar a sua meia-vida dentro das células. Apesar disto, o aumento dessa estabilidade geralmente acarreta em uma diminuição da especificidade/afinidade por seus alvos. A questão da veiculação é outro fator importante, pois não há como direcionar antissensos para um tipo celular específico e, dado sua natureza química, a veiculação destas moléculas por carreadores não imunogênicos faria com que esses oligonucleotídeos chegassem às células de forma despercebida pelo sistema imunológico. Apesar de alguns estudos enfatizarem a viabilidade da introdução destas moléculas por via intravenosa, em simples preparações aquosas, cautela deve ser tomada, pois os estudos ainda se concentram em cobaias. Atrelado a isto, grande variedade de nanopolímeros e/ou nanopartículas têm sido relatados como possíveis agentes de veiculação.

As DNAzimas que clivam RNA merecem destaque sobre as outras classes de oligonucleotídeos antissensos, pois são quimicamente mais estáveis, além de apresentarem

superioridade catalítica sobre aquelas (SKOBLOV, 2009; LI *et al*, 2010, SINGH *et al*, 2011). No ano de 2000 foi publicada uma pesquisa sobre o primeiro sistema de expressão de DNazimas (baseado em vetores plasmidiais) para atuar dentro de células humanas em cultura (CHEN *et al*, 2000). Durante os três anos subseqüentes, houve alguns aprimoramentos deste sistema (CHEN, 2002; CHEN *et al*, 2003; CHEN & MCMICKEN, 2003). O único modelo de vetor de expressão para DNazimas em procariotos conhecido até o presente momento foi descrito na literatura em 2004 (TAN *et al*, 2004). Todos estes sistemas supracitados são provenientes do desenvolvimento/aprimoramento de vetores produzidos por um mesmo grupo de pesquisa!

A expressão intracelular de DNazimas se faz importante porque apresenta o potencial de gerar uma quantidade adequada de DNazimas e por determinado período de tempo; evento necessário para se obter um efeito bioquímico/fisiológico desejado (SINGH *et al*, 2011). Os vetores baseados em plasmídeos são ferramentas que garantem a expressão dessas moléculas. Neste caso, por mais que moléculas de DNazimas estejam sendo degradadas de maneira relativamente rápida pelas nucleases celulares, elas também estarão sendo continuamente produzidas por estes vetores. Apesar do uso de vetores de expressão para DNazimas ser uma alternativa possível, a veiculação destas para o interior de células específicas (tanto eucarióticas como procarióticas) torna-se um desafio.

Em anos recentes, vem sendo observada na literatura uma reascensão do interesse da comunidade científica sobre o uso dos bacteriófagos enquanto agentes terapêuticos. O primórdio da fagoterapia surgiu bem antes da era dos antibióticos e teve seu início em aproximadamente 1920, contudo, foi abandonado com o início da antibioticoterapia (MATSUZAKI *et al*, 2005). A crescente resistência bacteriana aos antibióticos (inclusive com a proliferação de linhagens com resistência a múltiplas drogas) vem dando destaque novamente à fagoterapia, enquanto alternativa terapêutica. O uso em potencial de fagos é tido como a última alternativa a ser usada, quando a terapia com antibióticos não surti mais efeito. Para a fagoterapia, o FDA recomenda a utilização de fagos líticos, que reconheçam os fatores de virulência bacterianos, e que sejam obtidos de fontes naturais. A prudência com a utilização de fagos enquanto agentes terapêuticos são ainda norteadas por outros critérios que envolvem o organismo infectado, a bactéria infectante e o tipo de fago a ser utilizado.

Existem algumas abordagens que trazem luz a utilização de fagos mutantes, bem como fagos “engenheirados”. Estes últimos, em especial, têm ganhado grande interesse, principalmente após uma reinterpretação da técnica de apresentação de peptídeos na

superfície de fagos, conhecida, como “phage display”, onde se utilizam anticorpos para atingir alvos celulares (CAO *et al*, 2000; PANDE *et al*, 2010).

Apesar de existirem fagos altamente destrutivos e com elevada especificidade para um determinado tipo bacteriano, o que tornaria estes vírus um atrativo fantástico para a terapia da infecção, eles são rapidamente eliminados do corpo pelo sistema imune inato. Além do mais, sua utilização posterior é também prejudicada, pois entra em ação o sistema imune adaptativo, através de uma resposta imune humoral. Uma questão especula sobre o perigo da recombinação gênica entre o genoma de alguns fagos com o genoma dos organismos nos quais eles circulam, contudo, estas e muitas outras informações ainda precisam ser investigadas com maior profundidade (MERRIL *et al*, 2006). É interessante ressaltar que todos nós estamos ingerindo continuamente material genético presente na alimentação diária, originada de carnes, vegetais, e todos os demais microrganismos contaminantes presentes nos alimentos. Da mesma forma, somos alvos fáceis para muitas infecções, sejam elas parasitárias, virais (principalmente arboviroses), bacterianas ou fúngicas. Analisando por este ponto de vista é muito pouco provável que o uso de fagos venha a apresentar um perigo maior do qual já somos submetidos cotidianamente!

A extensão das aplicabilidades das tecnologias hoje existentes, ou mesmo a união/cooperação entre elas, constitui também um mecanismo imprescindível para a inovação. A utilização das DNAsimas enquanto promissores agentes terapêuticos aliados ao potencial uso de alguns fagos, enquanto agentes bactericidas e bacteriostáticos, representam metodologias com grande potencial terapêutico e que podem ser unidas para combater uma infecção bacteriana. O desenvolvimento de protótipos terapêuticos que unam estas ferramentas constitui um importante esforço de inovação tecnológica direcionada à terapia antimicrobiana.

■ ■ ■



OBJETIVOS



2.1 Objetivo Geral

Construir um sistema de expressão e veiculação de DNazimas para *E. coli*.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver DNazimas letais para *E. coli*.
- Construir um sistema regulado de expressão de DNazimas baseado em plasmídeo;
- Transformar o sistema plasmidial de expressão de DNazimas em fagomídeo;
- Avaliar o capsídeo do fago M13 como veículo carreador para o sistema de expressão de DNazimas;

■ ■ ■



REVISÃO DA **L**ITERATURA



3.1 Terapia de Oligonucleotídeos Antissenso

Em sentido estrito, oligonucleotídeos antissenso são curtos segmentos de DNA fita simples (ssDNA), ou de RNA, que realizam pareamento de bases do tipo Watson-Crick com outra cadeia polinucleotídica. O pareamento de oligonucleotídeos antissenso sobre seu substrato consiste na formação de um duplex, que pode ser híbrido (heteroduplex: DNA/RNA) ou não (homoduplex: RNA/RNA) (SKOBLOV, 2009; OH & PARK, 2009; TEDESCHI *et al*, 2009).

No interior da célula, os oligonucleotídeos antissenso podem alterar a expressão gênica por meio de uma “inativação” parcial, ou quase total, de transcritos de RNA (SKOBLOV, 2009; THOMPSON & PATEL, 2009). Esta inativação ocorre pela clivagem, ou mesmo degradação de parte, do RNA alvo. O RNA alvo pode ser tanto um RNA mensageiro (mRNA) quanto um RNA estrutural, ou não codificado. O modo como os transcritos são inativados dependerá do tipo de molécula antissenso atuante.

Pela capacidade notória que têm em inativar seus respectivos substratos, as moléculas de oligonucleotídeos antissenso representam uma importante ferramenta para o silenciamento gênico, pois impedem uma tradução eficiente. Estas moléculas, contudo, não são capazes de atuarem de modo mais eficaz devido a inúmeros fatores (EDER *et al*, 1991; CROOKE *et al*, 2000; SKOBLOV, 2009; TEDESCHI *et al*, 2009), entre os quais se destacam: (i) Elas são rapidamente degradadas no interior celular por endo e exonucleases e, por este motivo, devem ser continuamente supridas/produzidas neste meio; além do que, (ii) chegam em pequena quantidade dentro das células pela dificuldade que têm em atravessar a membrana plasmática, haja vista o caráter aniônico dessas moléculas. No que se refere à problemática descrita no “item i”, a ação das nucleases é realmente uma condição inevitável (KURRECK, 2003). Hoje existem inúmeros trabalhos que descrevem o melhoramento da estabilidade de antissensos, tanto de DNA quanto de RNA, por meio de modificações químicas, diminuindo, desta forma, sua degradação pelas nucleases (RASMUSSEN *et al*, 2007; SKOBLOV, 2009; LI *et al*, 2010).

Um conceito fortemente atrelado à terapia gênica está na idéia de que doenças sejam tratadas pela transferência ou inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos, para substituir ou complementar esses genes. De outro modo, doenças também podem ser desencadeadas por uma superexpressão gênica endógena, como o câncer ou a expressão de proteínas/toxinas de patógenos instalados (vírus, bactérias, fungos, vermes, etc.). Há casos em

que a terapêutica exige a redução de uma resposta fisiológica intermitente, como exemplo a inflamação crônica ou uma resposta imunológica danosa ou indesejada. Em outra condição, faz-se necessário impedir/reduzir a proliferação de um patógeno infeccioso, destruindo-o ou mesmo tornando-o passível de ser reconhecido pelos mecanismos imunológicos efetores do organismo. Para todos os casos expostos, o bloqueio ou redução da expressão de genes específicos poderia auxiliar para uma terapêutica mais eficaz (KATRIB, 2007; OH & PARK, 2009; SKOBLOV, 2009; THOMPSON & PATEL, 2009). Diante desses argumentos, o objetivo inerente à terapia antissenso é também incorporado ao conceito de terapia gênica.

3.2 Tecnologias de Terapia Antissenso

Entende-se por “tecnologias de terapia antissenso” a capacidade de arquitetar e manusear oligonucleotídeos como projéteis úteis para a inativação de determinado transcrito gênico, interrompendo, destarte, sua tradução. Atualmente, existem três variantes, ou classes, de tecnologias antissenso estabelecidas (SKOBLOV, 2009): (i) Oligodesoxinucleotídeos antissenso (AS-ODN); (ii) RNA de interferência (RNAi); e (iii) Ácidos Nucléicos Catalíticos (DNAzimas e Ribozimas);

A tecnologia antissenso foi primeiramente descrita em 1977, quando um fragmento de DNA fita simples foi capaz de inibir a tradução de um determinado mRNA, em um sistema de tradução *in vitro* (PATERSON, *et al*, 1977). Baseados neste fato, um ano mais tarde Zamecnik & Stephenson (1978) inauguram a “época da terapia antissenso”. Estes pesquisadores usaram uma molécula de DNA fita simples (AS-ODN), sintético, com 13 nt de comprimento e complementar a uma região do RNA 35S do vírus do sarcoma Rous, para impedir a transformação de fibroblastos de galinha, infectados com esse vírus, em sarcoma.

A especificidade de ligação das moléculas antissenso sobre seus substratos conferem a estas moléculas um grande atrativo para a farmacoterapia antissenso (termo em voga recentemente). Dallas & Vlassov (2006) afirmam que seqüências não maiores do que 20nt de comprimento, em uma dada coleção de transcritos celulares, podem assumir um alvo em potencial para a atuação de antissensos.

Detalhe importante sobre os alvos de moléculas antissenso é que estes devem estar “acessíveis” aos antissensos, ou seja, devem apresentar regiões nucleotídicas intracadeia não pareadas (RASMUSSEN *et al*, 2007) (figura 1). Sabe-se que moléculas de RNA, por existirem

na forma de uma única cadeia polinucleotídica, tendem a fazer pareamento de bases por meio de suas próprias seqüências complementares internas, dificultando, desta forma o acesso dos antissensos.

O aprimoramento, nos últimos anos, de interfaces contendo algoritmos que calculam e simulam a provável estrutura secundária tanto de moléculas de RNA como de DNA fita simples, em condições fisiológicas normais de temperatura e sais (ZUKER, 2003), permitiu guiar, de uma forma mais eficiente, o planejamento de antissensos. Na figura 1 são destacadas as regiões fita simples formadas em RNAs, após o seu “dobramento”. A estrutura "A": laço em grampo (em inglês, *hairpin loop*) - é onde o RNA dobra sobre si mesmo. A estrutura "B": laço interno (em inglês, *internal loop*) - é onde uma curta região não pareada existe entre dois ramos. A estrutura "C": um laço interno assimétrico (em inglês, *asymmetrical internal loop*) - é onde somente uma das fitas forma um pequeno laço, enquanto a outra continua, diretamente, de um ramo para o outro, isto é referido também como “bolha” (em inglês, *bulge*). A estrutura "D": laço de múltiplas ramificações (em inglês, *multi-branched loop*) - é o local de onde saem, ou convergem, vários ramos. A estrutura "E": ramo em dupla fita - é uma pequena região pareada. A estrutura "F": Pseudo nós – é uma região de longa interação, onde um “par de laços” se junta por meio de regiões pareadas. Todas estas estruturas constituem sítios potencialmente acessíveis às moléculas antissenso.

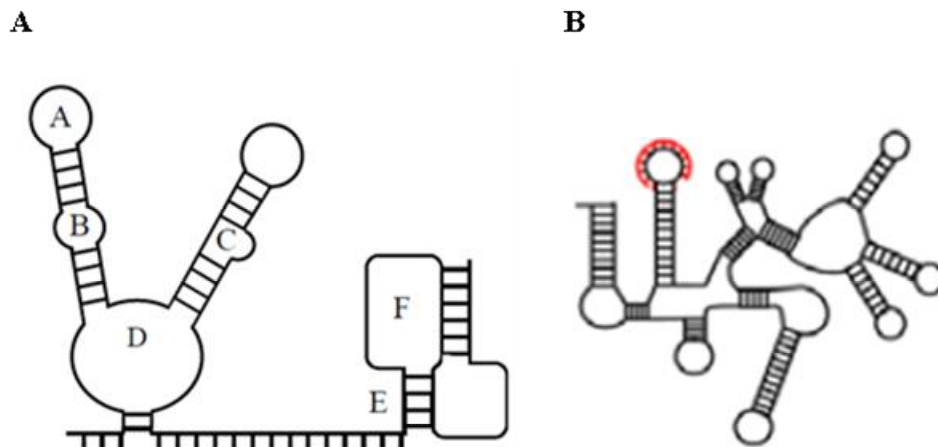


Figura 1. Representação diagramática da estrutura secundária de um RNA. A: Os trechos de seqüências acessíveis a Oligonucleotídeos antissensos estão representadas pelas letras: A; B; C; D; E; F (acompanhar explicação no texto). B: antissenso interagindo com uma região acessível do RNA.

Fonte: Rasmussen *et al* (2007).

A maior parte dos agentes terapêuticos convencionais (medicamentos alopáticos) atua após a tradução e interferem diretamente na função de proteínas, sejam elas estruturais, enzimáticas, ou com qualquer outra função celular. A principal desvantagem desta abordagem é que mutações pontuais no código genético destas proteínas podem rapidamente conferir resistência a estes agentes terapêuticos (KATRIB, 2007). De acordo com Katrib (2007), as mutações de seqüências gênicas podem ser “mais bem toleradas” pelos agentes antissenso, pois, havendo mutações na região de ação de um antissenso, o desenvolvimento de uma nova molécula antissenso para este mesmo local é extremamente simples. O modo como estas diferentes classes de moléculas antissenso agem é brevemente comentado a seguir.

3.3 Mecanismos de Ação dos Oligonucleotídeos Antissenso

3.3.1 Oligodesoxinucleotídeos antissenso (AS-ODN)

Os AS-ODN são seqüências curtas de ssDNA, com comprimento tipicamente variando entre 12 e 26 nt (THOMPSON & PATEL, 2009) e, como anteriormente mencionado, foram propostos como agentes terapêuticos por Zamecnik e Stephenson em 1978. De acordo com Singh *et al* (2011), o comprimento mínimo que um oligonucleotídeo antissenso deve ter para apresentar especificidade sobre determinado alvo de RNA em uma célula é de 11 nt, entretanto, a maioria dos AS-ODN que vêm sendo descritos na literatura apresentam comprimento que varia entre 15 e 25 nt. O modo de ação dos AS-ODN ocorre de duas maneiras: uma dependente de RNase H e outra por meio do bloqueio do processamento ribossomal (não-dependente de RNase H).

O mecanismo de funcionamento não-dependente de RNase H ocorre por meio do bloqueio direto da tradução, causado por uma mudança conformacional no segmento de mRNA, ligado ao AS-ODN, que está sendo traduzido, impedindo o avanço do ribossomo. Em teoria, a própria interação inicial do ribossomo ao transcrito pode ainda ser bloqueada, desde que o AS-ODN esteja pareado com a região de ligação ribossomal, na extremidade 5'-P do transcrito. O outro mecanismo, o mais comum, provoca a degradação da seqüência do mRNA que está pareada com a molécula de AS-ODN, mediado pela RNase H (KATRIB, 2007; RASMUSSEN *et al*, 2007; SKOBLOV, 2009) (Figura 2).

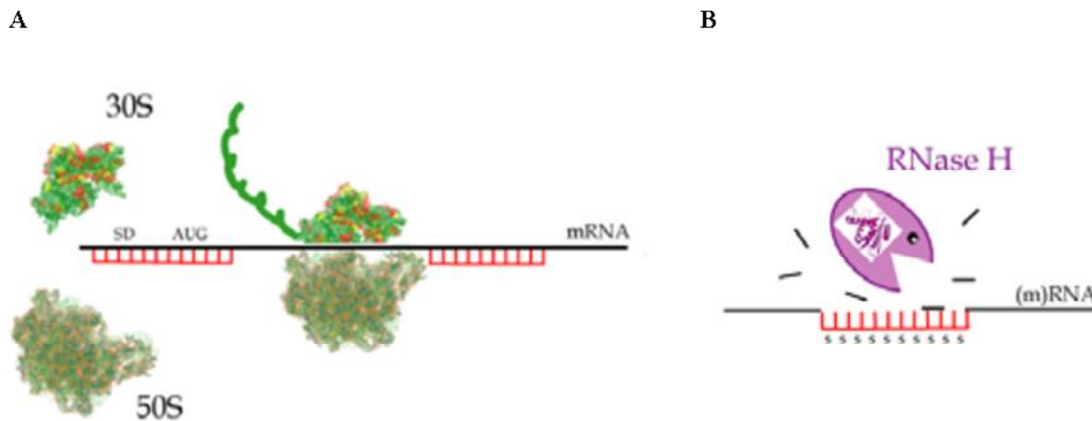


Figura 2. Mecanismo de ação dos AS-ODN. **A:** Bloqueio da tradução por impedimento do avanço ribossomal. **B:** Degradação do transcrito de RNA por RNase H.

Fonte: Adaptado de Rasmussen *et al* (2007).

Atualmente, sabe-se que o bloqueio da tradução por avanço do ribossomo em uma região onde o AS-ODN esteja pareado ao mRNA é pouco comum e depende do tipo de AS-ODN e da alteração conformacional formada pelo heteroduplex. Na maioria das vezes, entretanto, há apenas um atraso, ou breve parada, do ribossomo (KATRIB, 2007; RASMUSSEN *et al*, 2007). De acordo com Dallas *et al* (2006), AS-ODN contendo modificações químicas são mais propensos em impedir, de modo mais eficiente, o avanço ribossomal. Por este motivo, a principal rota de inibição da tradução por AS-ODN é realmente o mecanismo que envolve a clivagem do mRNA pela RNase H (KATRIB, 2007). A RNase H é uma endonuclease que requer um heteroduplex DNA-RNA como substrato para hidrolisar a fita de RNA; é uma enzima envolvida também na remoção de *primers* (iniciadores) de RNA durante a replicação do DNA (SKOBLOV, 2009).

3.3.2 RNA de interferência (RNAi)

O fenômeno intracelular denominado de RNA de interferência, ou “RNAi”, foi inicialmente descrito como ocorrendo naturalmente em plantas (JORGENSEN, 1990) e, posteriormente, em invertebrados, tendo seu período de grande destaque com o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (GUO & KEMPHUES, 1995; FIRE *et al*, 1998), aonde seu mecanismo de ação começou a ser elucidado.

Ocorrendo de forma natural em alguns organismos, até hoje foram descritos três vias de RNAi. Apesar de apresentarem processamento inicial distinto, todas as vias resultam em um modo peculiar de silenciar genes. As três vias de silenciamento gênico por RNAi são: (i) via clássica; (ii) via miRNA; e (iii) via rasiRNA.

O princípio geral da via de silenciamento por RNAi se dá quando um segmento de RNA dupla fita relativamente longo é processado por uma enzima citoplasmática altamente conservada, da família das RNase III, conhecida por Dicer. A Dicer origina pequenos segmentos RNAs dupla fita, conhecidos como RNAs de interferência (siRNA), de 21-23 nt de comprimento. Os siRNA são simétricos, com 2- a 3- nucleotídeos sobressalentes em suas extremidades 3'-OH. O siRNA processado pela Dicer continua associado a esta última quando são então incorporados por um complexo multiprotéico conhecido como RISC, o qual desata o duplex e usa uma das fitas como antissenso guia para procurar e degradar mRNA homólogos (Figura 3). O complexo RISC contendo uma das fitas do siRNA torna-se ativado ('holoRISC') e constitui, portanto, um complexo de silenciamento "guiado" por RNA. Desta forma, o mesmo continua a degradar mRNAs homólogos, amplificando o efeito do silenciamento (BERNSTEIN *et al*, 2001; DYKXHOORN *et al*, 2003; DORSETT *et al*, 2004; HANNON *et al*, 2004; DYKXHOORN *et al*, 2005; KOLE *et al*, 2012).

De acordo com Chendrimada *et al* (2005) e Lima *et al* (2012), é sabido que o processamento de longos RNAs fita-dupla, por DICER, envolve a associação desta última com uma proteína de ligação ao RNA de resposta a transativação pelo HIV-1 (conhecida pela sigla em inglês TRBP: HIV-1 TAR RNA binding protein). A Dicer ligada à proteína TRBP transfere o curto duplex de RNA para o complexo RISC. Após o desenrolamento do duplex, a fita antissenso se liga a uma endonuclease do complexo RISC, conhecida como Argonata 2 (Ago 2; também conhecida como *Slicer*), a qual é responsável direta pela clivagem dos alvos/substratos de mRNA. Apesar de existirem peculiaridades durante o processamento de longos RNAs dupla fita entre mamíferos, insetos, plantas e nematódeos, o princípio geral de silenciamento gênico é basicamente o mesmo.

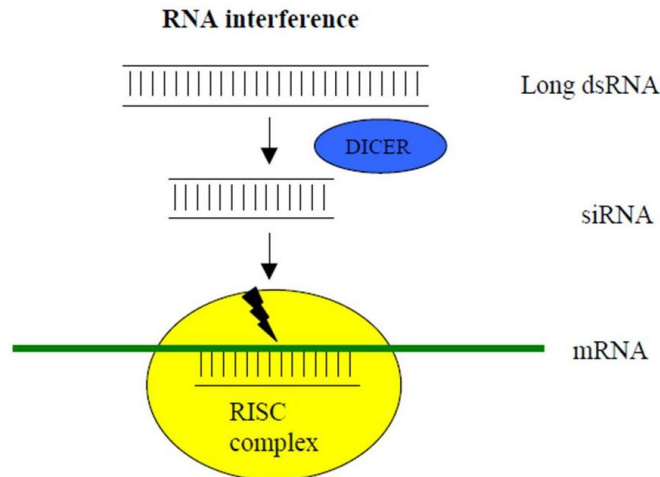


Figura 3. Esquema geral de silenciamento gênico por RNAi. O complexo DICER realiza o despareamento do siRNA e se associa com outras proteínas para formar um complexo ainda maior, conhecido por RISC. Este último utiliza uma das fitas como seqüência molde para clivar outro transcrito, por meio de pareamento de bases do tipo Watson-Crick.

Fonte: Katrib (2007).

Apesar de o princípio de silenciamento gênico por RNAi seguir um mesmo padrão a partir da geração dos siRNA, estes siRNA podem ser gerados/produzidos de diferentes formas, ou seja, eles têm processos de maturação diferentes. Por este motivo, convencionou-se dividir o processo de silenciamento gênico por RNAi em três vias: (i) a “via clássica” (ou siRNA); (ii) a “via rasiRNA” e (iii) a “via miRNA” (DYKXHOORN *et al*, 2003).

A “via clássica”, ou “siRNA”, consiste no processamento de um longo RNA dupla fita, como anteriormente descrito para o próprio processo geral de silenciamento gênico por RNAi.

A via “miRNA” (derivada de ‘microRNA’) se refere ao processo de geração de RNA dupla fita a partir de “pre-miRNAs”. Estes últimos são *hairpins* de RNAs com complementaridade imperfeita em seus ramos, originando bolhas (*bulges*), *mismatches* e pares de bases oscilantes G:U. Os pré-miRNA são formados no núcleo celular a partir de longos transcritos, sendo, ainda neste local, processados por um membro da família RNase III conhecido como Drosha, a qual produz um “hairpin” de ~70 nt de comprimento. Este pré-miRNA (mais curto) é exportado do núcleo para o citoplasma por um transportador conhecido como “exportina” (LEE *et al*, 2002; LEE *et al*, 2003; YI *et al*, 2003; DYKXHOORN *et al*, 2003). No citoplasma o “pre-miRNA” é clivado pela Dicer e então segue a via de processamento comum dos RNAs de interferências.

Em outra via de silenciamento gênico, pequenos RNAs também podem ajudar a preservar a integridade do genoma através da supressão de material genético invasivo, tais como os transposons, retrotransposons e vírus. Isto tem sido mostrado em estudo genéticos em *Drosophila*, *C. elegans*, *S. pombe* e plantas. Alguns destes pequenos RNAs são homólogos às regiões de DNA repetitivo e são por isso chamados de RNA de interferência associados às repetições (rasiRNA, do inglês: *repeat-associated siRNA*), incluindo transposons, retrotransposons, repetições centroméricas, e DNA satélite e microsátelite (DYKXHOORN *et al*, 2003; SHPIZ *et al*, 2009). Em *C. elegans* e *S. pombe*, estes pequenos RNAs mantêm regiões de cromatina contendo estas seqüências repetitivas silenciadas pela ativação da metilação em seqüências específicas deste DNA, além da metilação de histonas e também pelo recrutamento de proteínas associadas à heterocromatina.

Embora o processo de silenciamento gênico com RNAi, por meio da introdução de longos RNA fita dupla (dsRNA), tenha sido usada em uma variedade de organismos, incluindo *C. elegans*, plantas, *Drosophila*, mosquito e oócitos de ratos, seu uso em células de vertebrados está limitada. Esta limitação ocorre em virtude de uma supressão global da expressão gênica por meio de uma ativação, induzida por dsRNA, das vias de expressão de interferons (STARK *et al*, 1998; DYKXHOORN *et al*, 2003; MOSS *et al*, 2003; SLEDZ *et al*, 2003; LENZ, 2005; KATRIB, 2007). Alguns estudos (BRIDGE *et al*, 2003; SLEDZ *et al*, 2003; PERSENGIEV *et al*, 2004) ainda demonstraram que mesmo com o uso de curtos dsRNA, estes podem, ainda assim, induzir a proteína quinase PKR (proteína quinase ativada por RNA) e esta, subsequente, ativar a via do interferon. A expressão de interferons, induzida por dsRNAs, resulta na ativação da proteína quinase PKR e da 2',5'-oligoadenilato sintetase (2',5'-OAS). A ativação de PKR induz a fosforilação do fator inicial de tradução EID2 α e, com isso inibe o início da tradução. Como mencionado anteriormente, PKR pode, também, ser induzida diretamente por curtos dsRNA e, desta forma, por uma via alternativa, ativar a expressão de interferons. A ativação de 2',5'-OAS catalisa a conversão de ATP em uma série de curtos 2',5'-oligoadelilatos (2',5'-A) que então ativam uma enzima RNase L dependente de 2',5'-A. A ativação da RNase L causa uma extensiva clivagem de RNA fita simples no citosol.

Para complementar o preposto, Stark *et al* (1998) e Dykxhoorn *et al* (2003) alegaram também que longos RNA dupla fita podem ativar células a expressarem e liberarem interferons que atuam de modo parácrino ou autócrino, inibindo o crescimento celular e induzindo a possível apoptose.

Os problemas de uma possível terapia por RNAi com a utilização de longos RNA fita dupla foram sendo superados com a idéia de que o uso direto de siRNAs sintéticos curtos, e também *hairpin* de RNAs curtos (shRNAs), ludibriam este efeito de inibição inespecífica. Sendo assim, a inibição específica de mRNAs alvos em mamíferos se tornou executável/possível (BRUMMELKAMP *et al*, 2002; PAUL *et al*, 2002; LENZ, 2005). Contudo, subseqüentemente efeitos não-específicos de siRNA ainda têm sido descritos (JACKSON *et al*, 2003).

3.3.3 Enzimas de ácidos nucléicos: Ribozimas e DNazimas

Ribozimas e DNazimas são ácidos nucléicos fitas simples de RNA e DNA, respectivamente, que apresentam alguma atividade catalítica. Cada molécula contém uma seqüência conservada que forma uma estrutura secundária denominada de “motivo”¹, que é a principal responsável pela propriedade catalítica (KATRIB, 2007). Esses motivos são unidades estruturalmente independentes, formados a partir de elementos da estrutura secundária de ácidos nucléicos fita simples.

As ribozimas e DNazimas que clivam RNA têm dois componentes básicos: (i) um motivo catalítico formado por uma seqüência nucleotídica altamente conservada; e (ii) os “braços”, compostos por seqüência nucleotídica complementar ao alvo/substrato. Para que estes antissenso clivem seu substrato de RNA, deve ocorrer inicialmente a hibridização destas moléculas, por pareamento de bases do tipo Watson-Crick. Após esta etapa, é necessário que o alvo apresente também um ponto de clivagem, existente entre as regiões de complementaridade com os braços do antissenso. Este ponto de clivagem deverá ser reconhecido pelo antissenso para que ocorra o corte do substrato/alvo de RNA. Tanto DNazimas como Ribozimas dependem de cátions bivalentes como cofatores (SKOBLOV, 2009; KATRIB, 2007).

Ribozimas foram descobertas inicialmente em 1981 (CECH *et al*, 1981) e têm ocorrência natural no genoma de praticamente todos os organismos. Algumas delas já foram, e continuam sendo, otimizadas *in vitro* (VAISH *et al*, 1998; PÉREZ-RUIZ, 1999; KORE,

¹ Em analogia a “motivos protéicos”, que são estruturas supersecundárias de repetição, freqüentemente encontrados na estrutura de proteínas. Referem-se ao dobramento protéico apenas, não sendo possível prever a função da proteína, pois proteínas com diferentes funções podem ter alguns motivos iguais.

2000; HOVIG *et al*, 2001; RASMUSSEN, 2009; TEDESCHI, 2009; THOMPSON & PATEL, 2009).

As ribozimas de ocorrência natural são divididas em 5 classes (KATRIB, 2007), a saber: (i) Ribozimas do tipo *hairpin* (grampo); (ii) Ribozimas do tipo *hammerhead* (cabeça-de-martelo); (iii) Ribozimas pertencentes à classe dos íntrons do grupo I; (iv) Ribozimas da classe ribonuclease P; (v) Ribozimas do vírus delta (Δ) da hepatite. Entre estes, os dois mais vastamente estudados/caracterizados, devido principalmente ao pequeno tamanho e versatilidade, são as ribozimas dos tipos *hairpin* e *hammerhead* (PÉREZ-RUIZ, 1999; KATRIB, 2007; TEDESCHI, 2009).

As ribozimas associam-se diretamente a seu substrato de RNA pela complementaridade das seqüências nucleotídicas que flanqueiam o centro catalítico da molécula (braços da ribozimas). Isto resulta na formação de uma estrutura secundária necessária para a clivagem. Na presença de cátions bivalente tais como Mg^{2+} , o substrato é clivado no sentido 3' da seqüência de reconhecimento, gerando dois produtos: um com um fosfato cíclico 2'-3' e um com terminal 5'-OH. Após a clivagem, a ribozima pode ser liberada e, livre novamente, pode catalisar outras reações (HASELOFF *et al*, 1988; KATRIB, 2007).

As DNAzimas, do ponto de vista como as conhecemos hoje, foram inicialmente “descobertas” em 1997, por meio de experimentos de mutagênese *in vitro* (SANTORO & JOYCE, 1997). Dois diferentes motivos catalíticos funcionais foram encontrados nesses experimentos: DNAzimas com motivo “8-17” e DNAzimas com motivo “10-23” (SANTORO & JOYCE, 1997) (Figura 4), ambas com a atividade de clivar substratos de RNA. Essa busca por moléculas de DNA com propriedades catalíticas sobre RNAs ocorreu após constatação, em pesquisa pioneira desenvolvida por Breaker & Joyce (1994), de que segmentos curtos de DNA (e desconhecidos do ponto de vista estrutural) foram capazes de clivar substratos de RNA em ensaios cinéticos *in vitro*. Desde então, muitas DNAzimas com um amplo espectro de atividades tem sido selecionadas por este método (HÖBARTNER & SILVERMAN, 2007; JOYCE, 2004; PERACCHINI, 2005). Diferentemente das ribozimas, as DNAzimas não ocorrem, ou ainda não foram identificadas, ocorrendo naturalmente.

As atividades enzimáticas das DNAzimas descritas até o momento incluem: (i) Clivagem tanto de RNA quanto de DNA; (ii) Ligação de dois substratos de RNA; (iii) Formação de ramificação em RNAs; (iv) Metalinização de porfirinas; (v) Fosforilação de DNA; (vi) Ligação de DNA; (vii) Adenilação de DNA; (viii) Deglicosilação de DNA.

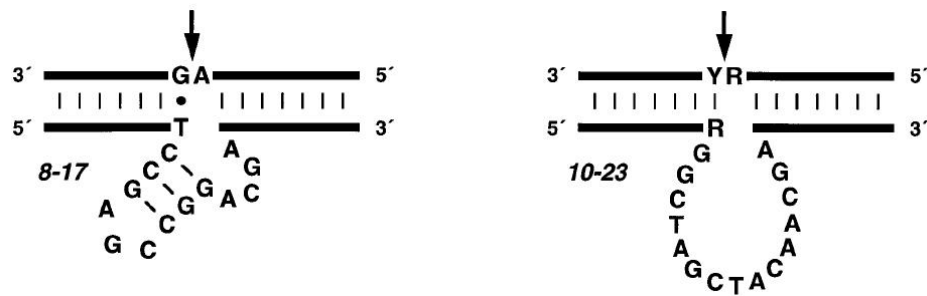


Figura 4. DNazimas com motivos 8-17 e 10-23. DNazimas que clivam RNA. Composição dos motivos catalíticos 8-17 e 10-23. DNazimas (fita inferior) se ligam aos seus substrato (fita superior) por meio do pareamento de bases Watson-Crick. A clivagem ocorre na posição indicada pelas flechas. R= A ou G; Y= U ou C.

Fonte: Santoro & Joyce (1997).

Tanto ribozimas como DNazimas possuem comportamento cinético e, algumas vezes, eficiência catalítica (mais DNazimas do que ribozimas) similar às enzimas peptídicas. Entretanto, do ponto de vista químico, possuem uma diversidade funcional muito menor (BAUM & SILVERMAN, 2008).

Santoro & Joyce (1997) afirmam que DNazimas são significativamente mais estáveis do que ribozimas, além de apresentarem uma eficiência de catálise maior do que aquelas. Dentre todos os oligonucleotídeos antissenso, as DNazimas com propriedade de clivar RNA são tidas como a ferramenta mais poderosa e promissora para a farmacoterapia antissenso (SKOBLOV, 2009).

3.4 Modificações Químicas em Oligonucleotídeos Antissensos

Os oligonucleotídeos sintéticos introduzidos em uma célula são imediatamente reconhecidos por esta como uma molécula estranha e logo se tornam alvos de nucleases endógenas (SINGH *et al*, 2011). Baseados neste preposto, para que os AS-ODN possam persistir dentro das células por um tempo necessário para sobrepujar a tradução de um transcrito de RNA, eles devem estar protegidos das nucleases.

De acordo com Kurreck (2003 *apud* SINGH *et al*, 2011) existem três locais passíveis de modificações químicas em um nucleotídeo: a base, o açúcar e o radical fosfato. Singh *et al* (2011) categoriza estas modificações em três tipos: oligonucleotídeos antissenso de 1^a, 2^a e 3^a geração.

Os oligonucleotídeos de 1ª geração contêm modificações em seu “eixo fosfato”. Estas modificações envolvem a substituição de um átomo de oxigênio da ligação fosfato por outro átomo, como o enxofre (fosforotioatos), um grupo metil (metilfosfonato), ou um radical amina (fosforamidato). Destes, os fosforotioatos têm mostrado uma melhor eficiência para o silenciamento de genes porque é suficientemente resistente às nucleases e não inibe a atividade da RNase H (CAMPBELL *et al*, 1990; ZON, 1995; SINGH *et al*, 2011). Apesar disto, os fosfotioatos têm baixa afinidade por suas “seqüências-alvo” e, por conseguinte, também apresentam uma baixa especificidade (CHEN *et al*, 2005).

Os oligonucleotídeos de 2ª geração incluem aqueles com modificações do tipo alquil como ligante do carbono 2 da ribose de nucleotídeos de RNA, o que tornam estes mais resistentes às nucleases. Nucleotídeos de RNA 2'-O-metil e 2'-O-metoxietil são os mais importantes membros desta classe. Outra característica é que esta classe é menos tóxica para o organismo do que os fosforotioatos, bem como apresentam uma melhor afinidade por seus alvos de RNA, além de não impedir a degradação deste alvo pela RNase H (SINGH *et al*, 2011).

Os oligonucleotídeos de 3ª geração englobam uma variedade de análogos de ácidos nucléicos que mostram elevada estabilidade térmica quando hibridizados com sua “seqüência-alvo” complemento, seja esta tanto uma molécula de DNA quanto um RNA. Esta estabilidade térmica é bem maior do que a existente entre duplex complementares de DNA:DNA e DNA:RNA. Os antissensos de 3ª geração contêm modificações mais drásticas nos elementos estruturais dos oligonucleotídeos do que os de 1ª e 2ª geração; são eles: oligonucleotídeos zwitteriônicos, peptídeos de ácidos nucléicos, ácidos nucléicos “fechados”, ácidos nucléicos hexitol, e morfolino oligonucleotídeos (SINGH *et al*, 2011).

Os oligonucleotídeos zwitteriônicos apresentam um equilíbrio de cargas positivas e negativas na molécula (NOE *et al*, 2005).

Os peptídeos de ácidos nucléicos (conhecidos pela sigla PNAs, derivada do inglês: *Peptide Nucleic Acids*) são estruturas químicas que mimetizam um segmento de oligonucleotídeo de DNA convencional. São estruturas onde o “corrimão” açúcar-fosfato do ácido nucléico foi substituído por unidades de 2-aminoetil-carbonil-glicina, permanecendo as bases nitrogenadas ligadas a este.

Os ácidos nucléicos “fechados” (conhecidos pela sigla LNAs, do inglês: *Locked Nucleic Acids* / ou ainda BNAs, do inglês: *Bridged Nucleic Acids*) são análogos de ácidos nucléicos no qual um anel é formado na ribose mediante a formação de uma ponte de metileno conectando o átomo de -O do carbono 2' com o carbono 4' deste açúcar.

Os ácidos nucleicos de hexitóis (conhecidos pela sigla HNAs, do inglês: *Hexitol Nucleic Acids*) apresentam a furanose substituída por um grupo hexitol de seis membros (anidrohexitol).

Nos oligonucleotídeos morfolinos (conhecidos pela sigla MFs, do inglês: *Morpholino Oligonucleotides*), a ribose é substituída por um grupo morfolino, e nestes compostos o radical fosfato é um fosforodiamidato.

Por conta das modificações mais drásticas em suas estruturas, os oligonucleotídeos de 3ª geração apresentam peculiaridades bastante distintas. Para uma breve revisão sobre este extenso assunto, recomendamos a leitura de Singh *et al* (2011).

3.5 Farmacocinética dos Oligonucleotídeos Antissenso

No campo da farmacocinética, poucos estudos foram e ainda estão sendo realizados. Um estudo envolvendo AS-OSN de segunda geração (YU *et al*, 2007) demonstraram que após introdução por via intravenosa, em cobaias e macacos, mais de 85% de AS-ODN permaneceram ligados às proteínas no plasma. Neste estudo, observou-se uma excreção renal inicialmente reduzida em decorrência de que os AS-ODN serem “capturados” rapidamente pelos tecidos, em especial fígado e rim; estes concentraram boa parte dos AS-ODN. Os próprios tecidos realizam o *clearance*, poucos oligonucleotídeos foram excretados na urina (AS-ODN não ligados às proteínas plasmáticas ou mesmo parcialmente degradados).

Geary *et al* (2009) e Zanardi *et al* (2012) relataram que modificações químicas melhoram significativamente a farmacocinética e as propriedades farmacodinâmicas dos antissensos.

Agrawal *et al* (1991) constataram que oligonucleotídeos completamente modificados com ligações do tipo fosforotioatos tiveram uma meia vida significativamente maior do que um oligonucleotídeo quimérico de 20 *mers*, composto por 15 ligações fosfodiéster e 4 ligações fosfotioatos. Somente 30% dos oligonucleotídeos fosforotioatos foram excretados pela urina depois de 24h, enquanto 75% dos oligonucleotídeos quiméricos foram excretados depois de somente 12h. Num estudo similar, Iversen (1991) constatou que os oligonucleotídeos fosforotioatos ficaram retidos nos tecidos do corpo de ratos adultos machos por um período de 20 às 40h. WALTON *et al* (1999) relatam que a administração contínua de oligonucleotídeos fosforotioatos resulta em uma ativação do sistema imunológico. Ainda é

escassos dados na literatura sobre a farmacocinética de oligonucleotídeos antissensos e muito ainda se há para elucidar e avançar neste campo!

De acordo com SKOBLOV (2009), o desenvolvimento de um sistema de entrega intracelular para Oligonucleotídeos antissensos é de extrema importância para sua atividade farmacológica.

3.6 DNazimas que Clivam RNA

As DNazimas que clivam substratos de RNA são as DNazimas com motivos catalíticos “10-23” e “8-17”. Estes termos foram cunhados por Santoro & Joyce (1997) e se referem a dois “pools” (ou populações) de moléculas de DNA que eram capazes de clivar substratos de RNA, durante experimentos de mutagênese *in vitro* por SELEX (sigla derivado do inglês: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*).

Compondo uma dessas populações havia uma mistura de oligonucleotídeos de DNA que possuíam uma região central que variava de 8 a 17 nt de comprimento. De forma símile, a outra população de moléculas possuía uma região variando de 10 a 23 nt de comprimento. Por fim, isolou-se de cada população as respectivas moléculas responsáveis pela atividade catalítica inicialmente constatada. Do pool “8-17”, descobriu-se que moléculas contendo um motivo catalítico conservado com 14 nt de comprimento eram as responsáveis reais pela clivagem dos substratos. Do mesmo modo, moléculas de DNA contendo um motivo conservado de 15 nt eram as atuantes do pool “10-23” (SANTORO & JOYCE, 1997).

Diferentemente da DNazima 8-17, a DNazima 10-23 é completamente intolerante às variações na composição nucleotídica em seu “motivo catalítico” (HÖBARTNER & SILVERMAN, 2007; BAUM & SILVERMAN, 2008). Estudos posteriores sobre modificações no motivo catalítico da DNazima 8-17 propiciou o surgimento de DNazimas com novas funções enzimáticas (HÖBARTNER & SILVERMAN, 2007; BAUM & SILVERMAN, 2008; JIANG *et al.*, 2010).

De acordo com Santoro & Joyce (1997) e Baum & Silverman (2008), no que se refere à capacidade de clivar moléculas de RNA as “DNazimas 10-23” apresentam maior eficiência catalítica do que as DNazimas “8-17”. DNazimas 10-23 são compostas por um ‘core’ central, formado por uma seqüência conservada de 15 nt de comprimento (responsável pela atividade catalítica), e dois braços de ligação ao substrato, que variam de 7-10 nt de

comprimento, os quais flanqueiam o centro catalítico da molécula. Para exercerem suas atividades catalíticas, as DNAzimas precisam se associar à cofatores, que geralmente são cátions bivalentes, na maioria das vezes o Mg^{++} , configurando, então, uma holoenzima. Em nível intracelular, o Mg^{2+} está em uma concentração de aproximadamente 2mM.(SANTORO & JOYCE, 1997; KABULI *et al*, 2004; HÖBARTNER & SILVERMAN, 2007).

A ligação da DNAzima ao seu substrato ocorre pela hibridização, ou complementarização, de bases nitrogenadas do tipo Watson-Crick. Após o reconhecimento há a clivagem do substrato, que ocorre obrigatoriamente entre uma purina e uma pirimidina (Y:R, respectivamente); a purina não realiza pareamento com a DNAzima e, ambas, Y:R permanecem voltadas para o centro catalítico da molécula (figura 5).

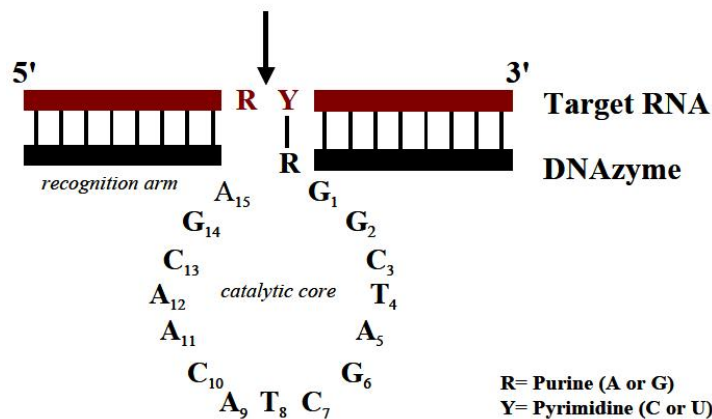


Figura 5. Representação esquemática da DNAzima 10-23 pareada a seu substrato. Da esquerda para a direita: o braço I (segmento 3'), motivo catalítico 10-23, o braço II (segmento 5').

Fonte: Katrib (2007).

Após a clivagem há a liberação de dois produtos, uma fita de substrato contendo o fosfato cíclico 2'-3' e o outro de extremidade 5'-OH livre (SANTORO *et al*, 1998). Apesar do conhecimento sobre o modo de ação de DNAzimas 10-23 sobre seu substrato de RNA, o mecanismo de ação destas moléculas ainda é pouco compreendido, principalmente sob o ponto de vista estrutural (NOWAKOWSKI *et al*, 1999; NOWAKOWSKI *et al*, 2000, KATRIB, 2007). De acordo com Santoro & Joyce (1997) e Katrib (2007), a atividade da DNAzima é caracterizada pela progressão por meio de múltiplas rodadas de ligação ao substrato de RNA, clivando e liberando o produto.

Santoro & Joyce (1997) afirmam que DNAzimas são significativamente mais estáveis do que ribozimas, são relativamente baratas e fáceis de sintetizar. Além do mais, Kurreck *et*

al (2002) mostraram que DNazimas 10-23 tem uma atividade de clivagem maior do que ribozimas. A eficiência catalítica (K_{cat}/K_M) pode chegar a $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, o qual é cerca de 100.000 maior que o dobro do valor mais alto observado para ribozimas, sob condições fisiológicas.

Katrib (2007) especula que o modo de ação da DNazima 10-23 combina ainda as vantagens observadas tanto para ribozimas como para AS-ODN, ou seja: a função enzimática *per si* e a de alvo/substrato para a RNase H, respectivamente. A respeito desta última, o heteroduplex formado pelo pareamento dos braços de DNazima com seu substrato de RNA constitui sim um alvo passível de ser degradado pela RNase H endógena! Ainda, pode atuar simplesmente de modo a bloquear a passagem ribossomal durante a tradução.

3.6.1 Mecanismo Cinético da DNazima 10-23

Uma rota cinética mínima tem sido estabelecida para descrever a clivagem de RNA por DNazimas (representada na figura 6). Esta rota é composta por 4 estruturas químicas: enzima (E) ou DNazima; o substrato de RNA (S); complexo DNazima/substrato de RNA (E.S) e Complexo DNazima/substrato de RNA clivado (E.P1.P2).

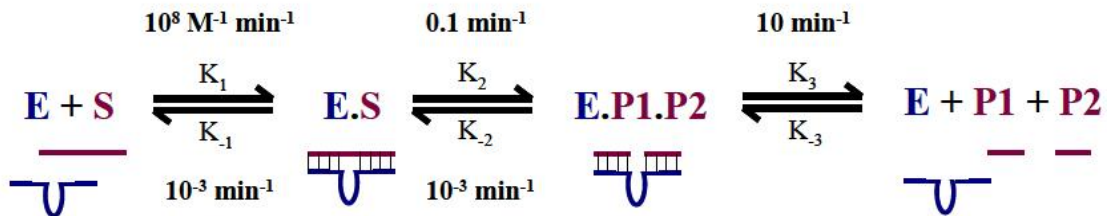


Figura 6. Rota cinética da DNazima que cliva RNA. E: DNazima; S: substrato de RNA; P1: produto de RNA 5'; P2: é o produto de RNA 3'; K: representa a constante de velocidade dos elementos para cada passo da rota. As constantes de velocidades para uma DNazima ideal são mostrados em Joyce (2001).

Fonte: Katrib (2007)

A etapa de ligação de DNazima é governada por k_1 e a dissociação do substrato de RNA é governada por k_{-1} . Na presença de um cátion de metal bivalente, o complexo enzima substrato (E.S) é clivado para a forma E.P1.P2. A clivagem ou o passo de ligação reversa é governado por K_2 e K_{-2} , respectivamente. A taxa de dissociação do produto é lenta e é governada por K_3 .

Para a hidrólise eficiente do alvo, é importante que K_1 esteja fortemente relacionada a uma alta tendência para a formação do duplex (10^8 M^{-1} , 2mM Mg^{2+}) e que K_2 seja substancialmente maior do que k_{-1} . Em acréscimo, K_2 deverá exceder substancialmente K_{-2} , e K_3 , não deverá ter uma velocidade limitada para o *turnover* catalítico (JOYCE, 2001). A constante de velocidade K_2 e K_{-2} tem sido mostrada ser essencialmente a mesma para virtualmente todas as DNAzimas 10-23. Em geral, estas moléculas tem uma velocidade catalítica de 0.1min^{-1} sob condições fisiológicas simuladas *in vitro* (SANTORO *et al*, 1998). Além do mais, a K_m para um substrato ideal é $< 1\text{nM}$, fornecendo uma eficiência catalítica K_{cat}/K_m de $10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (JOYCE, 2001). Deste modo, é geralmente aceito que as etapas de ligação e liberação do substrato, a quais são caracterizadas por uma torção da hélice formada pelas fitas de DNA e RNA, computa para a diferença entre os valores cinéticos para várias DNAzimas descritas na literatura.

3.6.2 Modificações químicas em DNAzimas 10-23

Muitas estratégias têm sido usadas para aumentar a estabilidade celular de DNAzimas 10-23. Estas estratégias incluem modificações químicas para tornar as DNAzimas mais resistentes ao ataque de nucleases e, com isso, aumentar a meia-vida delas no organismo. É importante destacar que, da mesma forma como existem esforços para aumentar a estabilidade química das DNAzimas, também existem estudos que relatam modificações em outros tipos de moléculas antissenso. Para uma melhor revisão sobre este tema, consultar Singh *et al* (2011).

Em DNAzimas, as principais modificações incluem: (i) Nucleotídeo invertido 3'-3' ao terminal 3' (SANTIAGO *et al*, 1999; SUN *et al*, 1999); (ii) Modificação fosforotioato (LU *et al*, 2005); (iii) Incorporação de ácido nucléico bloqueado/fechado (VESTER *et al*, 2002; FAHMY & KHACHIGIAN, 2004; VOLLMER *et al*, 2004; JIANG *et al*, 2010).

Estas modificações tornam a DNAzima 10-23 mais resistente à degradação por nucleases. Contudo, modificações químicas estão sempre associadas com alterações na eficiência de clivagem, toxicidade, ou interação não específica com proteínas celulares (GUVAKOVA *et al*, 1995; HENRY *et al*, 1999; LEVIN, 1999; ROCKWELL *et al*, 1997; WAHLESTEDT *et al*, 2000; FLUITER *et al*, 2005).

3.7 Sistemas de Expressão para DNazimas

Elas são relativamente estáveis e mais eficientes catalisadores do que qualquer outra metodologia antissenso já descrita (KURRECK *et al*, 2002; KATRIB, 2007). Apesar dessa estabilidade, DNazimas são degradadas por nucleases e necessitam ser supridas em quantidade apropriada para o interior da célula, a fim de manter uma inibição gênica de forma satisfatória (BAUM & SILVERMAN, 2008). Criar alternativas e/ou sistemas que pudessem gerar a liberação/produção destas moléculas no interior celular impulsionou a engenhosidade de alguns cientistas a partir do início da década de 2000.

De fato, a maneira ideal para manter a produção constante de DNazimas é pelo uso de vetores plasmidiais. É importante ressaltar que o desenvolvimento de vetores de liberação, ou “expressão”, DNazimas foi uma empreitada pioneira da empresa de biotecnologia “CytoGenix, Inc.” (Houston, USA), e que se iniciou na primeira década de 2.000.

3.7.1 Vetores de 1º geração para a expressão de DNazimas

Este sistema é constituído de dois plasmídeos, que atuam de maneira interdependente, e é exclusivo para células de humanas (de mamíferos) (CHEN *et al*, 2000). Um destes vetores é o pssXA e o outro, pssXB.

O cassete de expressão do vetor pssXA contém os seguintes genes: (i) enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia de ratos Moloney (MoMuLV-RT, do inglês: *Moloney Murine Leukemia Virus*); (ii) gene da enzima de restrição *MboII* (de *Moraxella bovis*). Em pssXA a transcrição é regulada pelo promotor pRSV (promotor do vírus do sarcoma Rous). A transcriptase reversa e a enzima de restrição são traduzidas na forma de uma cadeia polipeptídica fusionada. Apesar disto, cada uma delas mantém suas respectivas atividades enzimáticas.

O cassete de expressão do vetor pssXB é responsável pela liberação de um transcrito de RNA que contém, a partir de sua região 3', as respectivas estruturas: (i) uma região de ligação/reconhecimento para MoMuLV-RT (também conhecida por região BPS, sigla do inglês: *Primer Biding Site*), necessária para o início da transcrição reversa; (ii) um segmento nucleotídico contendo o sítio de clivagem para a enzima *MboII*; (iii) a seqüência propriamente dita da DNazima (ou seqüência de interesse); (iv) um segmento nucleotídico

contendo o sítio de clivagem para a enzima *MboII*; (v) um terminalizador de transcrição reversa. Em pssXB, o cassete de liberação de DNazima é transcrito pelo promotor constitutivo CMV (promotor do vírus Citomegalovirus - pCMV). Este cassete tem a peculiaridade de não ser traduzido. Ele é, portanto, transcrito na forma de uma molécula de RNA para, em seguida, ser convertido em DNA fita simples, ou DNazima.

A enzima MoMuLV-RT, expressa por pssXA, gera cópias de ssDNA a partir do transcrito de RNA liberado por pssXB (figura 7). A transcrição reversa ocorre quando MoMuLV-RT reconhece e se liga à sua região PBS, utilizando-se, pra isto uma molécula de tRNA^{pro} endógena da célula, que atua como iniciador da transcrição reversa. Enquanto a transcrição reversa ocorre, o heteroduplex formado é imediatamente desfeito por meio da degradação da fita de RNA, resultado da atividade RNase H intrínseca da enzima MoMuLV-RT. Deste modo, o ssDNA é liberado.

Haja vista que a seqüência da DNazima é flanqueada por segmentos nucleotídicos que contêm a região de reconhecimento para *MboII*, e estas últimas serem devidamente complementares umas às outras, a estrutura forma um ramo contendo um laço terminal (estrutura *stem-loop*). A seqüência de DNazima compreende a região do laço. A enzima de restrição *MboII*, também expressa por pssXA, reconhece seu sítio no ramo da estrutura e, assim, libera a DNazima no interior celular.

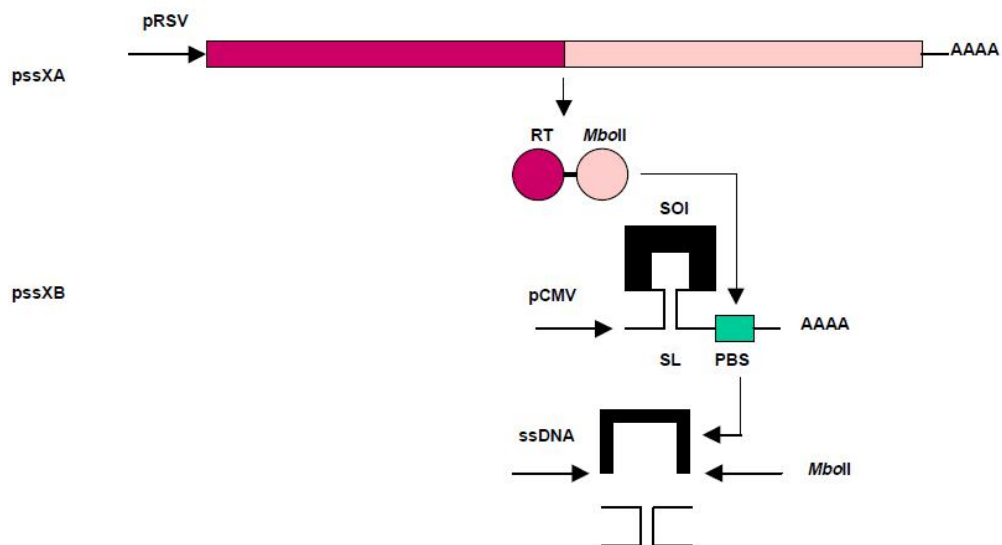


Figura 7. Sistema de expressão de DNazimas de 1º geração. Trata-se de um sistema de dois componentes. A enzima RT-MboII é expressa a partir do vetor pssXA. Por meio da ligação a PBS, inicia a síntese do cDNA (ou ssDNA) de transcrito de mRNA engenheirado em pssXB. ssDNA é liberado da seqüência flanqueada pela clivagem de *MboII*.

Fonte: Chen (2002).

Apesar da coerência do processo, existiram sérios empecilhos que impediram o sucesso deste sistema. Em primeiro lugar, é relativamente difícil, mesmo *in vitro*, manter dois vetores plasmidiais com funções distintas dentro de uma mesma célula. De acordo com Datta & Glazer (2001), a expressão de *MboII* em células de mamíferos inspira motivos para preocupação, haja vista sua capacidade em degradar DNA, além da potencial toxicidade sobre estas células. Outra questão a considerar é que não se sabe ao certo os possíveis efeitos/implicações causados à célula hospedeira o fato de esta albergar, e manter em condições ativas, dois sistemas de expressão distintos. De acordo com Chen (2002), todos estes fatos colaboram para tornar a utilização deste sistema em estudos clínicos impraticável.

3.7.2 Vetores de 2ª geração para expressão de DNazimas

Diferentemente do sistema de liberação de DNazimas de 1º geração, que se utilizava de dois vetores plasmidiais, o de 2º geração apresenta a flexibilidade de possuir apenas um vetor. Este último resultou, em parte, da junção dos dois plasmídeos usados nos sistemas de 1º geração aliado a engenhosas estratégias transcricionais.

No vetor de 2º geração, o gene MoMuLV-RT foi isolado de pssXA e fusionado com o cassete de expressão de DNazima de pssXB, para formar um único transcrito regido por um único promotor. A partir daí, surgem dois tipos vetores de 2º geração, pssXD e pssXE, diferindo apenas quanto ao tipo de promotor colocado à montante do referido cassete. pssXD contém o pRSV e pssXE contém o pCMV (promotor do vírus citomegalovírus). Nestes sistemas fica excluído definitivamente o gene da enzima *MboII* e seus respectivos sítios, que flanqueavam a seqüência condizente à DNazima.

O cassete de expressão dos vetores de 2º geração apresentam, em sentido 5'→3', as seguintes estruturas: (i) Promotor pCMV ou pRSV – a depender do tipo de vetor, se pssXD ou pssXE, respectivamente; (ii) Gene MoMuLV-RT, contendo um códon de parada de tradução (*stop-codon*); (iii) Uma estrutura de ramificação em alça (também conhecida pela sigla em inglês: SL, de *Stem-Loop*), formada a partir de seqüências repetidas invertidas. Esta estrutura atua como um terminalizador da transcrição (independente de ρ) reversa de MoMuLV-RT; (iv) A seqüência da DNazima de interesse; (v) Uma região de ligação/reconhecimento (PBS) da MoMuLV-RT, necessária para o início da transcrição reversa; e (vi) Um terminalizador de transcrição (dependente de ρ), para o final da

transcrição do cassete como um todo.

Na figura 8 é apresentado o esquema geral de funcionamento do vetor de 2ª geração. Nele, ocorre primeiramente a transcrição de todo o cassete regido pelo promotor. A partir deste transcrito, ocorre a tradução da enzima transcriptase reversa, que, por sua vez, é responsável pela transcrição reversa do segmento de RNA que originará a DNAzima. A MoMuLV-RT inicia a transcrição reversa após o reconhecimento da região PBS e utiliza como “iniciador” de transcrição uma molécula de tRNA^{pro} endógena da célula. A transcrição ocorrerá até que a transcriptase reversa encontre a estrutura de ramificação em alça, que atuará como terminalizador de transcrição. Enquanto a transcrição reversa ocorre, o heteroduplex é imediatamente desfeito por meio da degradação da fita de RNA, resultado da atividade RNase H intrínseca da enzima MoMuLV-RT e a DNAzima é, então, liberada!

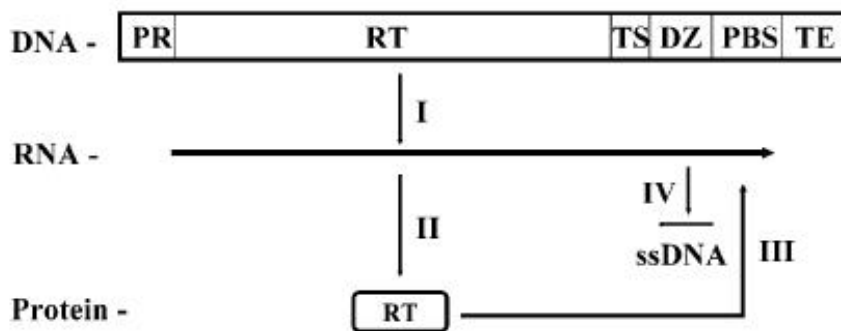


Figura 8. Sistema de expressão de DNAzimas de 2º geração. PR: promotor; RT: transcriptase reversa; TS: seqüência de parada da transcrição reversa; DZ: seqüência que codifica a DNAzima; PBS: sítio de ligação da transcriptase reversa; e TE: seqüência terminalizadora para todo o cassete. TS-DZ-PBS correspondem ao cassete de expressão de DNAzima. Primeiramente (I) ocorre a transcrição de uma longo RNA a partir do qual ocorre a (II) tradução do gene da transcriptase reversa que, por conseguinte, (III e IV) utiliza o cassete de expressão de DNAzima, contido na extremidade da longa molécula de RNA, para produzir a DNAzima de interesse, via transcrição reversa. O RNA molde é destruído pela atividade RNase de MoMuLV-RT.

Fonte: Tan *et al* (2004).

3.7.3 Vetores de Expressão para DNAzimas em Procariotos

Apesar das duas primeiras gerações de vetores de expressão para DNAzimas terem sido construídos para atuarem em células humanas (de mamíferos), os cientistas envolvidos ainda não haviam percebido sua importância para o contexto procariótico. Em outras

palavras, era uma tecnologia/ferramenta majoritariamente procariótica, mas direcionada para uso/aplicação em células eucarióticas. Assim, em 2004, o mesmo grupo de pesquisa que havia projetado os primeiros vetores de expressão de DNazimas, também o projetaram para atuar em *Escherichia coli* (TAN *et al*, 2004), modelo procariótico melhor estudado sob o ponto de vista genético e bioquímico.

O protótipo procariótico foi elaborado a partir das bases do vetor pssXE, originando, destarte, o pssXGa. Este último contém uma origem de replicação para *E. coli* e um promotor (fortemente regulável) que permite regular de forma bastante eficiente a transcrição de todo o cassete de expressão que produzirá a DNazima. Este cassete, em sentido 5'→3', apresenta as seguintes estruturas: (i) Promotor PL_{tetO-1}; (ii) Gene da transcriptase reversa MoMuLV-RT, contendo um códon de parada de tradução (*stop codon*); (iii) Uma estrutura de ramificação em alça (*stem-loop*: SL), formada a partir de seqüências repetidas invertidas, e que atua como terminalizador de transcrição (independente de ρ) da enzima MoMuLV-RT; (iv) A seqüência de DNazima de interesse; (v) Um sítio de ligação/reconhecimento (PBS) para a MoMuLV-RT, necessária para o início da transcrição reversa; e (vi) Um terminalizador de transcrição (dependente de ρ) para o final da transcrição do cassete como um todo.

O vetor pssXGa apresenta um mecanismo de funcionamento geral semelhante aos vetores de 2º geração pssXD e pssXE (figura 9), entretanto, com as seguintes peculiaridades (haja vista se tratar de um vetor feito para funcionar em *E. coli*): (i) O promotor PL_{tetO-1} é específico para *E. coli*, sendo este fortemente reprimível pela “proteína repressora Tet” e fortemente induzido por aTC (anidrotetraciclina); (ii) A região de ligação/reconhecimento (PBS) da transcriptase reversa MoMuLV-RT, que em *E. coli* difere da região PBS usada para células de mamíferos. Quanto a esta última característica, a diferença reside no fato de que, em células eucarióticas, MoMuLV-RT se utiliza de uma molécula de tRNA^{pro} endógena (MESNARD & LEBEURIER, 1991; MARQUET *et al*, 1995; MAK & KLEIMAN, 1997; TAN *et al*, 2004) necessário como iniciador da transcrição, enquanto que em procariotos a mesma enzima inicia a transcrição com um tRNA^{val}.

No que se refere ao iniciador para a transcriptase reversa MoMuLV-RT em *E. coli*, Tan *et al* (2004) afirma que o tRNA^{pro} procariótico é estruturalmente diferente do tRNA^{pro} eucariótico e não pode, portanto, ser “capturado” (utilizado) por esta enzima. Ainda de acordo com estes autores, o tRNA^{val} procariótico é o que mais se assemelha, em nível estrutural, do tRNA^{pro} eucariótico e é, portanto, o candidato de escolha da enzima para o início da transcrição reversa. Marquet *et al* (1995) expõe que a região “PBS” para

transcriptases reversas é um segmento complementar a porção 3' final do tRNA iniciador. Neste caso, pelo fato de que células procarióticas se utilizam do tRNA^{Val}, obviamente a região “PBS” utilizada em pssXGa é diferente daquela que foi utilizada para os demais vetores de expressão de DNazimas, em células de mamíferos.

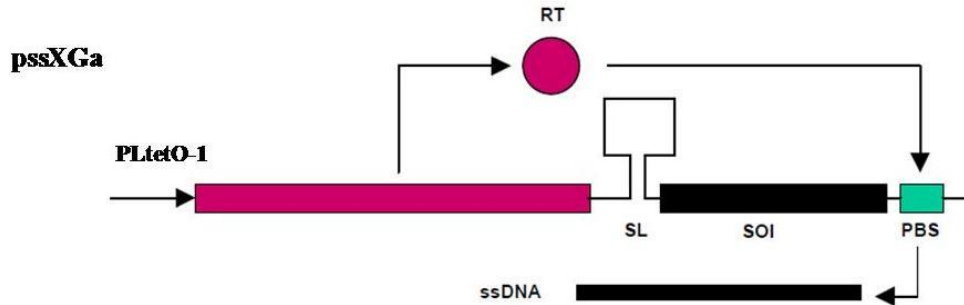


Figura 9. Sistema de expressão de DNazimas desenvolvido para *E. coli*. Este sistema, contido em pssXGa, é baseado nos sistemas de expressão de DNazimas de 2^o geração.

Fonte: Adaptado de Chen (2002).

Após a divulgação do vetor pssXGa (TAN *et al*, 2004) transcorreram-se 6 anos até que outro trabalho envolvendo vetores de expressão de DNazima, baseado em plasmídeo, (LI *et al*, 2010) viesse a ser novamente divulgado em trabalhos científicos. É interessante ressaltar que nos anos subsequentes a 2004, a empresa CytoGenix, Inc. enfrentou uma grave crise financeira, o que a obrigou encerrar suas atividades. Somente nos últimos dois anos, esta empresa começou a ser reestruturada. O Dr. Lex Cowsert, atual diretor da empresa, relatou, em consulta, que os pesquisadores envolvidos, direta ou indiretamente, com esta linha de pesquisa atualmente não estão mais atuando nesta área. O mesmo ainda informou que os vetores pssXA, pssXB, pssXD, pssXE e pssXGa são produtos patenteados pela CytoGenix, Inc.

O trabalho publicado por Li *et al* (2010) descreve a construção de um vetor de expressão de DNazimas controlado por dois promotores. Este sistema é direcionado para células humanas. O vetor foi denominado pSDE01–DZt1 e apresenta as seguintes características: (i) dois cassetes de expressão, regidos por promotores independentes: um dos cassetes, responsável pela expressão da enzima transcriptase reversa MoMuLV-RT, está sob o controle do promotor P_{EF-1 α} (promotor do fator de alongação 1 α). O outro cassete, responsável pela liberação do transcrito de RNA, substrato para a transcriptase reversa produzir a DNazima de interesse, está sob controle do pCMV; (ii) a região/segmento contendo a seqüência da DNazima está localizada entre sítios de restrição: isto implica

predizer que o vetor tem o potencial de ser utilizado para atingir qualquer alvo de RNA desejável, bastando-se, pra isto, trocar a seqüência de DNAzima.

O vetor bifuncional pSDE01–DZt1 reúne características dos vetores de 1º geração (um promotor controlando a expressão de MoMuLV-RT) e dos vetores de 2º geração (a enzima transcriptase e o transcrito de RNA da DNAzima contidos em um único vetor). De acordo com Li *et al* (2010), este sistema apresenta uma maior eficiência na liberação de DNAzimas do que os demais. Isto decorre do fato de que o vetor apresenta dois promotores diferentes e separados, regendo a produção de dois transcritos que necessitam ser produzidos em quantidades diferentes. Ou seja, deve haver uma maior taxa de transcrição para o RNA da DNAzima e uma menor produção da transcriptase reversa (que, *per si*, é bastante ativa). Este ajuste não desloca/compromete a maquinaria bioquímica da célula para superexpressar a construção de interesse, como se especula que aconteça para os vetores pxxXD e pssXE (LI *et al*, 2010). Para que se entenda melhor esta última especulação: os vetores de 2ª devem produzir uma quantidade suficiente do molde de DNAzima (ou seja, o cassete de RNA) para que a transcriptase reversa possa gerar estas moléculas em quantidades adequadas para o processo de silenciamento. Entretanto, a produção desse molde de DNAzima automaticamente promoverá um aumento, também, da transcriptase reversa. Um excesso desta enzima poderia ser tóxico para a célula. Esta é, possivelmente, a razão que torna os vetores de 2ª geração não eficazes sob o ponto de vista funcional.

Outro caso de vetor para DNAzimas, diferente dos vetores da série pssX e do vetor bifuncional pSDE01–DZt1, é o uso do genoma circular de M13 como vetor de produção e, também, entrega de DNAzimas. Este protótipo, baseado em bacteriófago, foi publicado por Fei Chen e colaboradores no ano de 2004 (CHEN *et al*, 2004). Este protótipo é extremamente simples e consiste na inserção da seqüência nucleotídica da DNAzima na região de múltiplos sítios de clonagem do genoma de M13mp18. Estes autores afirmam que, durante a forma replicativa de M13mp18 (RF M13mp18), quando o genoma do fago é convertido à fita simples, a seqüência nucleotídica referente à DNAzima assume sua arquitetura secundária característica e, assim, é capaz de clivar seu respectivo substrato. É válido ressaltar que, portanto, não se trata de um vetor de expressão para DNAzimas, mas um vetor que apresenta a DNAzima de interesse funcionando durante, apenas, a fase replicativa do genoma viral. Neste trabalho foram utilizadas DNAzimas que atuaram sobre o mRNA de uma β -lactamase TEM (figura10). De acordo ainda com os autores, esta DNAzima necessita da mesma concentração de Mg^{2+} (seu cofator) do que uma DNAzima livre. Sobre este sistema, não foram mais encontrados relatos na literatura científica, o que o torna, ainda, propenso de ser

mais bem avaliado.

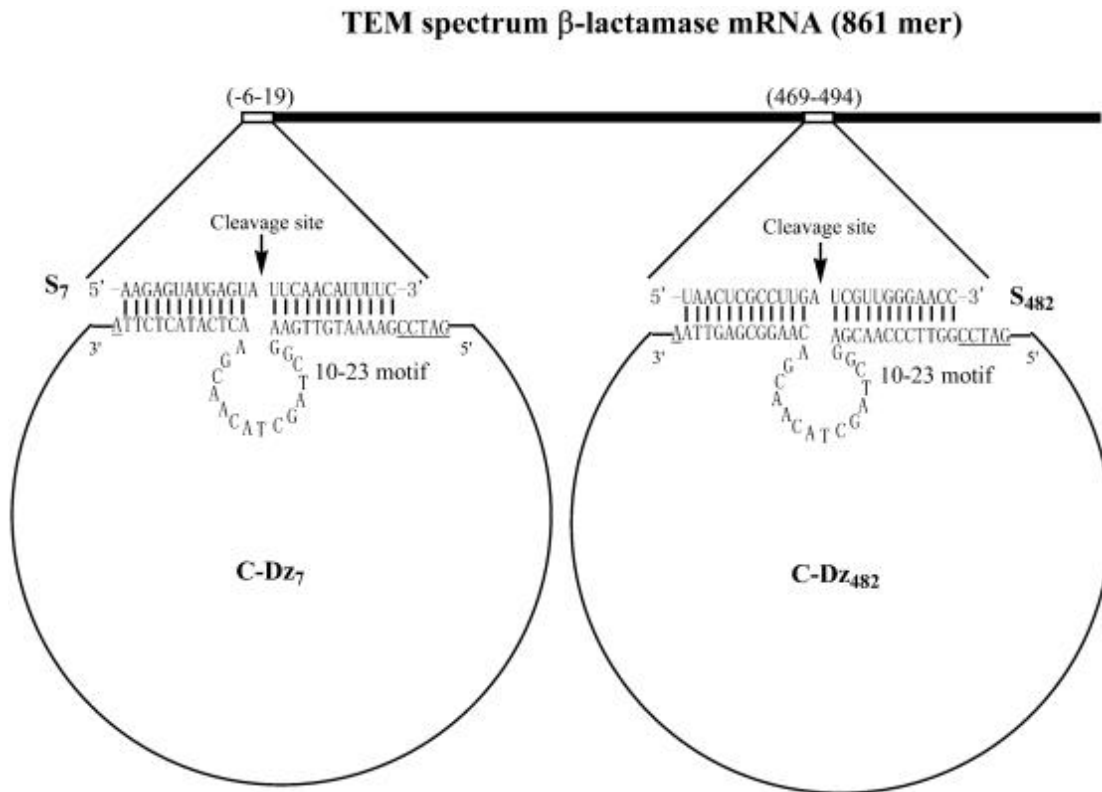


Figura 10. DNAzimas projetadas em M13mp18. Estrutura da DNAzima ligada ao genoma circular de M13mp18. Neste exemplo, duas DNAzimas atuam sobre o mRNA de β -lactamase TEM, em *E. coli*.

Fonte: Chen *et al* (2004).

3.8 Sistemas para Entrega de DNAzimas

Com o intuito de desenvolver um sistema para a “entrega celular” de DNAzimas 10-23 (sistema *delivery*), alguns métodos vêm sendo investigados. Entre estes métodos, destacam-se o uso de polímeros catiônicos baseados em ciclodextrinas, lipossomos catiônicos, dendrímeros, e nanopartículas de ouro. Apesar do potencial uso destes, não há seletividade celular e, por conta disso, as DNAzimas deveriam ser administradas, em um paciente, de modo freqüente para que ocorra uma resposta fisiológica de longa duração (BENSON *et al*, 2008; DASS *et al*, 2008; TAN *et al*, 2009). Para células procarióticas não existem descritos “sistema *delivery*” para a entrega de DNAzimas 10-23.

3.9 Bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus que infectam especificamente bactérias. Eles estão amplamente distribuídos na natureza e promovem drásticas manifestações na ecologia bacteriana, tanto em meio líquido quanto em meio sólido.

A presença de “agentes” que eram capazes de matar bactérias já vinha sendo cogitada há muito tempo, contudo, na época carecia de provas mais conclusivas. Hankin (1896) relatou que as águas dos rios Jumma e Ganges teriam a capacidade de matar alguns tipos de bactérias, especialmente *Vibrio cholerae*. Ele mostrou que essa capacidade asséptica era filtrável e sensível à fervura, o que levou a crer que se tratava de uma substância química volátil. De acordo com Dias (2011), em 1901, Emmerich e Löw descreveram uma substância presente em culturas autolisadas que tinha a capacidade de lisar diversas outras culturas, efeito curativo em infecções experimentais e provia imunidade profilática a inoculações subseqüentes. Estes experimentos iniciais foram limitados a observações em culturas líquidas já que no início da bacteriologia as culturas eram conceitualizadas como um organismo em si e não como uma população dinâmica de células individuais.

Segundo Matsuzaki *et al*, (2005) e Dias, (2011), em 1915 Frederick W. Twort publicou um artigo em que notou o crescimento de algumas colônias contaminantes de *Micrococcus* (hoje conhecidos como *Staphylococcus*) com aparência mucóide, aquosas e vítreas. Ele interpretou esses resultados como sendo algo semelhante a uma doença infecciosa aguda de *Micrococcus*. Independentemente, em 1917, Félix d’Herelle descreve um micróbio antagonista às bactérias, lisando-as em culturas líquidas e formando manchas discretas, as quais ele chamou de placas, na superfície de ágar contendo bactérias semeadas. Pensando em se tratar de ultravírus que invadem bactérias e se multiplicam, tais organismos foram denominados bacteriófagos (d’Herelle, 1917).

Os fagos são seres não vivos, com material genético envolto em uma capa protéica. Por se tratar de seres com vida intracelular obrigatória, os vírus não podem se multiplicar fora das células bacterianas. Ou seja, os fagos devem encontrar um tipo bacteriano susceptível, inserir nesta seu material genético (DNA ou RNA), e utilizar sua maquinaria celular no sentido de produzir mais fagos. A célula bacteriana que é susceptível à infecção é chamada de hospedeira.

Matsuzaki *et al*, (2005) relatam que existem aproximadamente 5.100 fagos descritos e que estes são classificados em 13 famílias, de acordo com sua morfologia, tipo de ácido

nucléico e presença ou ausência de envelope ou lipídeo (Tabela 1). Ackermann (2011) ainda relata que o número de espécies de fagos na natureza pode ser estimado em centenas de milhares, ou mesmo milhões, principalmente após o início das investigações metagenômicas.

Tabela 1. Classificação filogenética dos fagos. Classificação dos fagos de acordo com Matsuzaki *et al* (2005).

| Order | Family | Morphology | Nucleic acid | | |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------|------------------------------------|--|
| <i>Caudovirales</i> | <ul style="list-style-type: none"> — <i>Myoviridae</i> — <i>Siphoviridae</i> — <i>Podoviridae</i> | | Double-stranded DNA | | |
| | | | | <i>Tectiviridae</i> ^a | |
| | | | | <i>Corticoviridae</i> ^a | |
| | <i>Lipothruxviridae</i> ^b | | | | |
| | <i>Plasmaviridae</i> ^b | | | | |
| | <i>Rudoviridae</i> | | | | |
| | <i>Fuselloviridae</i> | | | | |
| | <i>Inoviridae</i> | | | | |
| | <i>Microviridae</i> | | | | |
| | <i>Leviviridae</i> | | | | |
| | <i>Cytoviridae</i> ^b | | | | |
| | | | Single-stranded DNA | | |
| | | | Single-stranded RNA | | |
| | | | Segmented, double-stranded RNA | | |

^a Lipid containing

^b Enveloped

Fonte: Matsuzaki *et al* (2005)

De acordo com Matsuzaki *et al* (2005), cerca de 96 % dos fagos atualmente descritos são fagos caudados compostos de uma cabeça icosaédrica e uma cauda, e todos eles têm seu genoma formado por DNA fita dupla. Fagos caudados são classificados dentro de três famílias, de acordo com as feições morfológicas de sua cauda: *Myoviridae* (com cauda contrátil. Exemplo: KVP20, KVP40, KVP241 e fagos T-*even*); *Siphoviridae* (com caudas longas não-contráteis. Exemplo: ϕ MR11 e λ); e *Podoviridae* (com caudas extremamente curtas e não contráteis. Exemplo: T7). Estas três famílias compreendem a ordem *Caudovirales*. Os outros fagos, classificados dentro das outras dez famílias, representam somente 4% do total de fagos e apresentam morfologia cúbica, filamentosa ou pleomórfica. Eles contêm genomas de RNA ou de DNA (fita dupla ou fita simples). Embora a maioria dos fagos terapêuticos seja caudada, alguns fagos cúbicos (ϕ X174 e Q β) ou filamentosos (M13 e Pf3) têm também sido usados.

3.9.1 O ciclo de vida dos fagos

Vários passos durante o ciclo de vida dos fagos são comuns a todos os vírus: adsorção, liberação do ácido nucléico de seu capsídeo, replicação e expressão do mesmo, montagem, liberação e transmissão (DUCKWORTH, 1987).

A adsorção dos bacteriófagos ocorre em duas etapas. Na primeira, a adsorção ocorre pela interação com uma estrutura definida na superfície celular, após um contato inicial, e é reversível. Neste momento, o fago pode, ainda, perder a interação com o receptor e não conseguir infectar a célula. A segunda etapa ocorre por meio de uma ligação irreversível entre a estrutura fágica e o receptor presente na superfície bacteriana.

Após a adsorção, a parede celular bacteriana é permeabilizada pelo uso de enzimas presentes na cauda ou capsídeo do fago, possibilitando, portanto, a inserção do material genético viral enquanto o capsídeo permanece fora da célula. Após a inoculação do genoma, este pode seguir dois caminhos, (i) ser integrado ao genoma do hospedeiro ou (ii) permanecer no citoplasma. Para os vírus, este é um estágio onde o genoma do fago existe dentro do hospedeiro, mas fora do seu local habitual, ou seja, o genoma está fora da estrutura viral, mas a expressão gênica, replicação do genoma e morfogênese ocorrem normalmente (WEINBAUER, 2004).

O período de latência é a fase da infecção onde não há fagos livres ou extracelulares detectáveis. Descreve a fase do ciclo que varia entre a adsorção e a lise. O período anterior à montagem dos capsídeos e inclusão dos genomas é conhecido como período de “eclipse”. O período de crescimento é caracterizado pela liberação de fagos maduros livres (vírions). Os números de vírions liberados por célula para o meio é chamado de *Burst size*.

Fagos caudados causam lise celular por um sistema duplo de lise, constituído por hidrolases de peptidoglicanos (endolisinas), que atacam o peptidoglicano, e holinas, que danificam a membrana plasmática e permitem que as endolisinas tenham acesso ao peptidoglicano (ACKERMANN, 1999). Os fagos podem também ser liberados por brotamento ou extrusão. O estágio extracelular termina com a inviabilidade do fago ou uma nova infecção. Os fagos mostram vários ciclos de vida: lítico, lisogênico, pseudolisogênico e infecções crônicas (figura 11).

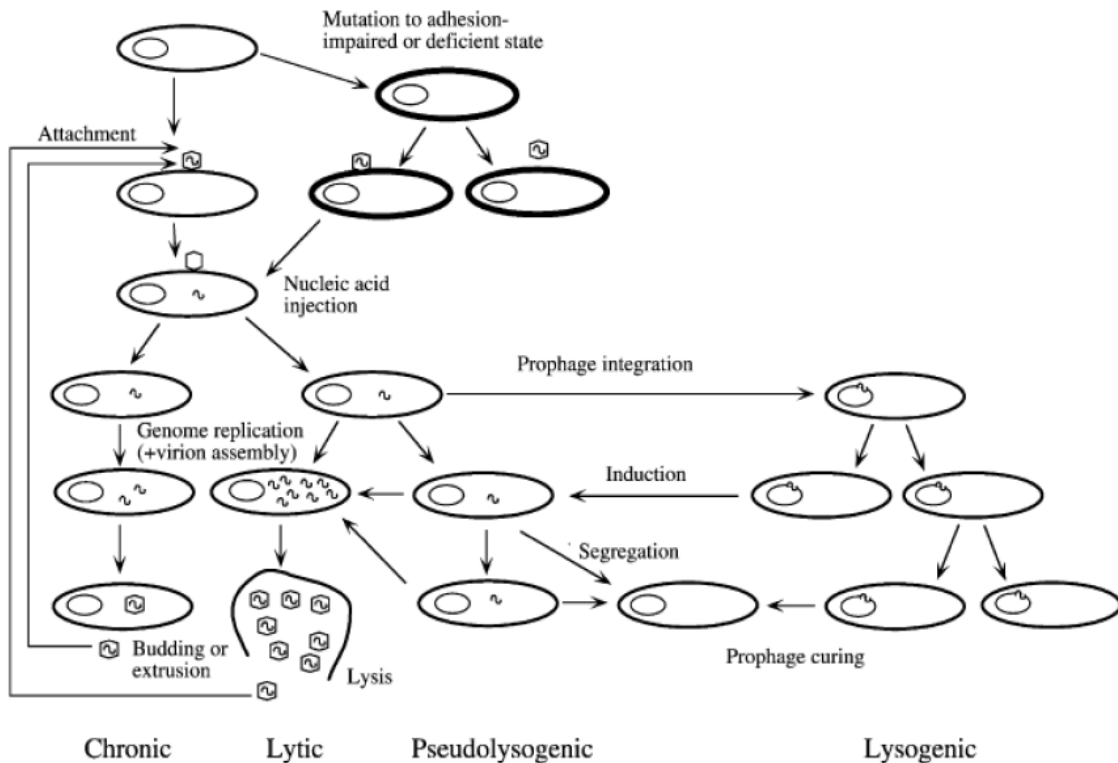


Figura 11. Ciclo de vida dos bacteriófagos. Os diversos ciclos de vida dos bacteriófagos. Infecções crônicas, com o brotamento ou extrusão de vírions; ciclo lítico, levando a lise celular, pseudolisogenia, algumas células se mantêm não infectadas e lisogenia, onde é observada a presença do profago.

Fonte: Weinbauer (2004).

No ciclo lítico, os fagos (líticos ou virulentos) direcionam a maquinaria do hospedeiro para a produção de novos fagos, os quais são liberados pela lise celular. O ciclo lisogênico se caracteriza pela manutenção do genoma (lisogênico ou temperado) em um estado de dormência (profago), em que este se replica juntamente com o genoma do hospedeiro, até que o ciclo lítico seja induzido. A decisão lisogênica dos fagos temperados, pelo estabelecimento do profago ou não, acontece após a introdução do material genético no interior celular. Infecções crônicas ocorrem quando uma célula é infectada e a progênie viral é constantemente liberada por brotamento ou extrusão. Em infecções persistentes (pseudolisogenia, estado de carreador), os fagos se multiplicam apenas em uma fração da população celular. Pseudolisogenia e “estado de carreador” são amplamente usados como sinônimos, no entanto o “estado de carreador” é mais estritamente utilizado para bactérias contendo profago na forma de plasmídeo (ACKERMANN & DUBOW, 1987; WEINBAUER, 2004)

3.9.2 Fagoterapia

A terapia por fagos, ou fagoterapia, é um método que utiliza de uso de fagos para o tratamento de doenças causadas por infecções bacterianas e foi introduzida por Félix d'Herelle em aproximadamente 1920, de acordo como relatado por Matsuzaki *et al* (2005). Matsuzaki *et al* (2005) descreve que esta descoberta ocorreu cerca de 20 anos antes da aplicação prática da penicilina (o primeiro antibiótico). Embora a fagoterapia tenha sido usada para tratar e prevenir doenças causadas por infecção bacteriana na antiga União Soviética (pioneira) e em outros países da Europa Oriental, ela foi abandonada enquanto promessa terapêutica pela Europa Ocidental na década 1940, com a chegada da “era do antibiótico”. Pouco tempo depois, a “era do antibiótico” também deu fim a fagoterapia na Europa oriental.

O surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos tem, recentemente, motivado a comunidade científica mundial para uma reavaliação da terapia com fagos. Esta terapêutica, a priori, seria aplicada às infecções bacterianas incuráveis pela antibioticoterapia convencional (MATSUZAKI *et al*, 2005; DIAS, 2011). Para uma revisão histórica da experiência soviética com a fagoterapia, consultar Carlton (1999) e Sulakvelidze *et al* (2001).

Para Matsuzaki *et al* (2005), a fagoterapia tem muitas vantagens sobre a antibioticoterapia: (i) é efetiva contra bactérias patogênicas resistentes à multidrogas, porque os mecanismos por meio do qual induzem a bacteriólise diferem completamente daqueles pelos quais agem os antibióticos; (ii) eles são altamente específicos para um alvo bacteriano; (iii) eles podem responder rapidamente ao surgimento de bactérias mutantes resistentes a fago porque, eles mesmos, são capazes de se mutar também e continuar infectando suas hospedeiras; (iv) o custo do desenvolvimento de um sistema terapêutico baseado em fagos é muito mais barato do que o desenvolvimento de um novo antibiótico; e (v) os fagos e seus produtos não afetam células eucarióticas.

De acordo com o FDA (BRÜSSOW, 2012) as vantagens oferecidas pela fagoterapia são que: (i) os fagos são altamente específicos para um hospedeiro bacteriano; (ii) Eles funcionam quando todas as alternativas terapêuticas falharam; (iii) eles mesmo se “auto dosam” para infectar uma população bacteriana limitada; e (iv) são, geralmente, não tóxicos. O lado negativo, ainda de acordo com o FDA, é que: (i) a resistência bacteriana aos fagos pode ocorrer, ainda que seja bem mais rara do que a resistência a antibióticos; (ii) a farmacocinética dos fagos pode não ser ideal, como consequência da imunogenicidade

destes; e (iii) a resposta imune secundária pode limitar a re-utilização dos fagos após uso intravenoso.

Com respeito ao perfil dos fagos terapêuticos, o FDA recomenda que: (i) sejam usados somente fagos obrigatoriamente líticos; (ii) que os fagos sejam “não transdutores”² (pois impede o *clearance* do corpo); que (iii) sejam usados fagos que reconheçam, preferencialmente, fatores de virulência bacterianos (pois fagos que reconhecem receptores comuns a uma determinada espécie poderiam destruir as cepas comensais normais do organismo, como por exemplo as existentes no intestino); e (iv) que os fagos sejam oriundos de ambientes naturais. O FDA relata ainda que é importante caracterizar os produtos sintetizados por cada fago, por meio da análise de sua seqüência de DNA; esta caracterização deve satisfazer a exclusão de qualquer possibilidade de possíveis príons causadores de doenças. Apesar de o FDA considerar que fagos oferecem, relativamente, um baixo risco, testes de toxicidade em sistemas animais, testes de esterilidade e estabilidade são também obrigatoriamente necessários (BRÜSSOW, 2012).

O FDA incrementa que o uso de *cocktails* de fagos é completamente aceito se isto comprovar um aumento do espectro do tratamento, devendo, para isto, que cada um dos fagos componentes mostrem atividade e estabilidade (BRÜSSOW, 2012). Para Brüssow (2012) a fagoterapia já é um fato na Rússia, com inúmeros *cocktails* sendo vendidos em drogarias/farmácias, assim como também na Ucrânia e Bielo-Rússia. A maior parte desses produtos vem de uma empresa chamada Microgen (<http://www.microgen.ru/#/press/>). Lamentavelmente, a Microgen não publica detalhes acerca de seus *cocktails* de fagos, e também dos dados clínicos que evidenciem a eficácia desses produtos, tornando difícil o acesso a estas preparações. De acordo com Brüssow (2012), por esta razão, o Centro de Pesquisa da Nestlé deixou de fornecer preparações contendo fagos purificados de *E. coli* para a Microgen.

Algumas companhias como a Intralytix (<http://intralytix.com>), localizada nos Estados Unidos da América, desenvolveram “cocktails” de fagos anti-*E. coli* e anti-*Listeria* para serem utilizados na indústria alimentícia. Estes *cocktails* foram devidamente patenteados sendo o *cocktail* anti-*Listeria* aprovado pelo FDA para ser usado como um aditivo alimentar (MERRIL *et al*, 2006; EDGAR *et al*, 2012). Em Banbury, cidade localizada no condado de Oxfordshire, na Inglaterra, existe uma companhia indiana chamada Gangagen (<http://www.gangagen.com/>), que se dedica a pesquisas envolvendo fagoterapia. Esta

² Transdução é o processo no qual DNA é transferido de uma bactéria para outra via bacteriófago. Ela também se refere ao processo no qual DNA estranho é introduzido em outra célula, via vetor viral.

companhia se dedica principalmente à investigações sobre proteínas de fagos com propriedades antibacterianas.

Maura *et al*, (2012) conseguiram provar que um *cocktail* dos fagos CLB_P1, CLB_P2, and CLB_P3 foram capazes de reduzir significativamente a presença de *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), cepa O104:H4, que colonizava o intestino de ratos. Pouillot *et al* (2012), utilizando o fago lítico EC200^{PP}, obteve uma mortalidade de 100% em *E. coli* O25b:H4-ST131 causadoras de sepse e meningite, em filhotes de ratos.

Em 1980, Smith *et al* (1980) infectaram ratos com *E. coli*, por inoculação intramuscular e intracerebral. Após isto, estes autores demonstraram que uma única dose intramuscular de uma solução contendo o fago anti-K1 foi mais efetivo para o tratamento dos animais do que múltiplas doses intramusculares de tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol ou sulfametoxazina/trimetropina. Este trabalho merece destaque especial porque foi a publicação que reacendeu o interesse da Europa ocidental pela fagoterapia, como comentado pelo próprio Smith anos mais tarde (SMITH *et al*, 1987).

Capparelli *et al* (2007), analisando a influência do fago M^{Sa} sobre ratos infectados com *Staphylococcus aureus* concluíram que, ao injetarem simultaneamente em cada rato 10^8 UFC (unidade formadora de colônia) de *S. aureus* e 10^9 UFP (unidade formadora de placa) do fago, houve recuperação 97% dos animais infectados. Neste mesmo experimento, quando estes animais eram infectados com doses não letais da bactéria (5×10^6 UFC/rato) e os fagos eram inoculados 10 dias após essa infecção, houve uma eliminação de 100% destas bactérias de todos os animais. Embora tradicionalmente considerado como um patógeno extracelular, *S. aureus* pode ser internalizado por um macrófago e sobreviver dentro desta célula. No estudo de Capparelli *et al* (2007) também foi descrito que, quando uma partícula do fago M^{Sa} é inserida sozinha dentro um macrófago contendo *S. aureus* o fago não reduz em nada o número de bactérias no macrófago. Contudo, se *S. aureus* é previamente infectada com M^{Sa} e estas bactérias são fagocitadas pelo macrófago, o número destas bactérias é significativamente reduzida dentro desta célula.

Um estudo interessante envolvendo a tecnologia de *phage display* originou um fago M13 modificado, contendo em sua superfície anticorpos específicos contra antígenos da superfície celular de *Helicobacter pylori*. Este fago não se multiplica em *H. pylori*, mas foi capaz de suprimir *in vitro* seu crescimento e, quando administrado por via oral, também causou uma redução do número dessa bactéria no estômago de ratos infectados (CAO *et al*, 2000).

3.9.3 Farmacocinética de fagos

Apesar dos primórdios da fagoterapia remontarem desde aproximadamente 1920, muito ainda se tem a pesquisar sobre a questão farmacocinética dos fagos. Estes estudos foram grandemente prejudicados pela “era dos antibióticos”, que ofuscou seu desenvolvimento.

De acordo com Merrill *et al* (2006), muitas das aplicações dos fagos na terapia contra infecções bacterianas envolvem preparações orais destes vírus. Estas preparações têm a vantagem de diminuir os efeitos colaterais causados por possíveis contaminantes como endo e exotoxinas, que freqüentemente estão presentes após as etapas de purificação/isolamento dos fagos. As preparações orais contendo fagos não são necessariamente a melhor forma de administração destes, em especial quando se trata de casos de infecções sistêmicas. Portanto, conhecer a fundo a farmacocinética dos fagos é uma necessidade de extrema urgência!

Em 1921, Appelmans, em uma análise qualitativa, observou que após injetar fagos no sistema circulatório de coelhos, estes vírus eram detectados no baço dos animais, dias depois da inoculação, contudo, sua presença em outros órgãos não foi detectada (APPELMANS, 1921). Este achado foi confirmado doze anos mais tarde por Evans (1933) quando, após três dias depois da injeção intravenosa de fagos em um coelho, o fígado, o baço e o sangue do animal sacrificado foram analisados. Esta análise também confirmou a presença dos fagos somente no baço, excluindo-se a presença deste no fígado e sangue do animal (EVANS, 1933). É importante destacar que ambas as pesquisas eram qualitativa, ou seja, detectavam somente a presença ou ausência do fago nestes órgãos após incubá-los em meios de cultura contendo suas respectivas bactérias hospedeiras.

Um dos primeiros estudos quantitativos sobre o destino dos fagos em animais foi apresentado em 1934, por Nungester & Watrous. Estes pesquisadores relataram que a inoculação de 10^9 UFP de um fago anti-*Staphylococcus* em ratos albinos, previamente infectados com a mesma bactéria, diminuiu o título destes para 10^5 UFP em cinco minutos e para aproximadamente 4×10^1 UFP, duas horas após a inoculação. Esta rápida eliminação do vírus no sistema circulatório foi atribuída aos órgãos que fazem parte do sistema retículo endotelial, principalmente o fígado e baço (NUNGESTER & WATROUS, 1934).

Em 1973, Geier *et al* (1973) analisou a distribuição do fago λ no organismo de ratos brancos estéreis (livres de germes). Pela condição de serem estéreis, esses ratos não apresentavam nenhum anticorpo contra o fago λ . Apesar disto, estes animais também apresentaram uma rápida eliminação dos fagos de seu sistema circulatório e a retenção dos

mesmos no baço, após a inoculação intravenosa dos mesmos. Isto comprova a participação do sistema inato (sistema retículo endotelial) na eliminação destes fagos. Geier *et al* (1973) ainda demonstraram que quando uma preparação oral dos fagos era oferecida a estes animais, traços dos mesmos ainda eram encontrados em alguns órgãos e também no sangue destes.

Merril *et al* (1996) selecionaram dois fagos lambda variantes e perceberam que eles passavam mais tempo na circulação sanguínea de ratos que os fagos lambda normais. Resultados similares também foram obtidos para variantes do fago P22, que infecta *Salmonella typhimurium*, quando os mesmos foram inoculados em ratos (MERRIL *et al*, 1996). Em ambos os experimentos, constatou-se uma menor morbidez e mortalidade dos animais que foram tratados com estes fagos.

As experiências descritas até aqui sugerem que o sistema retículo endotelial do sistema imune inato é o grande responsável pelo rápido *clearance* dos fagos no sistema circulatório. Sokoloff *et al* (2000), utilizando-se da técnica derivada da apresentação de bibliotecas peptídicas em fago *-phage display*, constatou que fagos T7 contendo peptídeos externos com resíduos de lisina ou arginina em sua região C-terminal apresentaram uma meia vida mais longa na circulação sanguínea de ratos. Estes resíduos de lisina e arginina mostraram ser capazes de proteger o fago T7 contra a atuação da via alternativa do sistema complemento³, do sistema imunológico. Em ratos isto ocorre porque os resíduos C-terminal de lisina e arginina, presentes nos peptídeos apresentados na superfície do fago T7, interagem com proteína C reativa (PCR), uma proteína plasmática normalmente elevada em ratos. Em humanos os mesmos experimentos demonstraram que os fagos T7 resistentes a inativação pela via alternativa do sistema complemento, possuíam peptídeos contendo a região C-terminal formada por resíduos de tirosina (e não por lisina ou arginina, como nos experimentos com ratos). Outra diferença é que em humanos é a proteína plasmática α_2 -macroglobulina que se liga aos resíduos de tirosina da superfície do fago (e não a proteína C reativa, como nos experimentos com ratos – no plasma humano a proteína C reativa não é elevada) (SOKOLOFF *et al*, 2000).

Como descrito acima, a técnica de apresentação de peptídeos sobre a superfície de fagos apresenta grande potencial como uma alternativa para o rápido *clearance* de fagos na circulação sistêmica. Além do mais, este método pode vir a direcionar fagos para locais específicos do corpo, por meio da atividade “ligante-receptor”. A seleção de ligantes

³ Em seu estado normal, o fago T7 também é inativado pela via alternativa do sistema complemento (SOKOLOFF *et al*, 2000).

direcionados a sítios receptores de qualquer tipo celular permitiria também descolar estes fagos para o tratamento de infecções localizadas (MERRIL *et al*, 2006).

Em algumas infecções como a tuberculose, em que o a infecção intracelular do macrófago pelo microrganismo pode servir como um reservatório para a expansão da infecção ao longo do corpo, o uso de fagos apresenta algumas vantagens. Broxmeyer *et al* (2002) demonstrou ser possível entregar o fago lítico TM4 para dentro dos macrófagos usando *Mycobacterium smegmatis* (um *Micobacterium* não virulento) como vetor. Em seus experimentos, Broxmeyer *et al* (2002) mostraram que tal técnica foi capaz de reduzir o título de *Mycobacterium avium* e *Micobacterium tuberculosis* que infectavam culturas de macrófagos.

Um detalhe muito importante sobre a farmacocinética de fagos é que, diferentemente dos outros agentes terapêuticos, eles têm genoma. De acordo com Merrill *et al* (2006), existe evidência de que fragmentos de genomas de fagos podem entrar diretamente nas células dos mamíferos. Doerfler *et al* (1995) e Schubert *et al* (1998), por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) encontraram fragmentos de DNA genômico dos fagos M13 e lambda em células do trato intestinal, leucócitos do sangue periférico, além das células do fígado e baço. Um achado espantoso foi quando Doerfler *et al* (1995), alimentando camundongos com o DNA do fago M13 misturado a comida, por uma semana, acharam um fragmento de DNA de 1.299 pb do fago M13 ligado covalentemente a um fragmento de 80 nt, o qual apresentava 70% de homologia com o gene do receptor de IgE. Doerfler *et al* (1995) ainda confirmaram, por meio de hibridização *in situ*, a presença de DNA do fago M13 em raras células de fetos de camundongos, dos quais a mãe era frequentemente alimentada com fagos; este DNA encontrava-se integrado aos cromossomos.

De acordo com Merrill *et al* (2006) o risco em potencial da integração do DNA de fagos ao genoma de mamíferos pode acarretar, por exemplo, em uma possível perda da heterozigose de genes supressores e tumor. De acordo ainda com este autor, estudos em seres humanos são ainda necessários para elucidar sobre as grandes especulações que cercam este assunto. É importante destacar que fagos são cosmopolitas e, por conseguinte, estamos diariamente expostos a estes vírus (assim como também a plasmídeos bacterianos) presentes no ambiente ou enquanto contaminantes de muitos alimentos. Por este fato, é improvável pensar que não estamos ingerindo “replicons” diariamente e isto atenua a idéia de usarmos fagos como agentes terapêuticos. Para Brüssow (2005), a presença constante de bactérias e fagos no intestino humano faz pensar que isto é um evento bastante comum. O mesmo ainda

afirma que os fagos lambda e M13 são normalmente encontrados em 1-4% de amostras de fezes humanas analisadas rotineiramente.

De acordo com Larocca *et al* (2002), outra abordagem sobre fagos é que a engenharia genética destes pode capacitá-los para servirem como vetores de entrega de genes defeituosos, em células de mamíferos que apresentem tais disfunções.

Os fagos, enquanto agentes terapêuticos, não são agentes farmacológicos passivos, pois são capazes de crescimento exponencial, haja vista serem agentes infecciosos de bactérias. A amplificação dos fagos está atrelada ao tamanho da população bacteriana infectante do hospedeiro (MERRIL *et al*, 2006). De acordo com Merrill *et al* (2006), o entendimento farmacocinético do emprego de fagos contra infecções bacterianas exige o conhecimento de três componentes dinâmicos e suas interações complexas: (i) o humano infectado; (ii) a bactéria infectante; e (iii) o fago. Destes três componentes dinâmicos, dois deles, a bactéria e o fago, são capazes de crescer exponencialmente durante o curso de suas respectivas infecções.

Um dos primeiros pesquisadores que reconheceram a necessidade de estudos quantitativos para determinar se os fagos podem sustentar um crescimento exponencial *in vivo* foram Rene Dubos e seus colaboradores (DUBOS *et al*, 1943). Estes pesquisadores contaminaram camundongos por inoculação intracerebral de *Shigella dysenteriae*. Após a inoculação dos fagos no mesmo local de infecção (cérebro) foi demonstrado que a capacidade de recuperação dos animais infectados foi de 72%. O grupo de animais infectados que não recebeu tratamento apresentou uma sobrevivência de apenas 3,6%.

Smith & Huggins (1982), 39 anos após o experimento de Dubos *et al* (1943), demonstraram o mesmo resultado em experiências semelhantes. Smith & Huggins (1982) infectaram ratos com *E. coli* K1; alguns animais foram infectados intracerebralmente e outros intramuscularmente. Em ambos os casos, os fagos usados para o tratamento foram administrados por meio de injeção intramuscular. Foram constatados níveis mais altos dos fagos nos tecidos infectados (cérebro ou músculo) e estes níveis caíram quando os níveis bacterianos nesses tecidos também caíram. Infelizmente os estudos de Smith & Huggins (1982) não apresentam dados significativos, pois poucos animais foram usados em seus experimentos.

Baseados nos estudos de Smith & Huggins (1982), Levin & Bull (1996) desenvolveu um modelo que sugere quatro elementos críticos para uma terapia fágica bem sucedida: (i) como fagos usados na fagoterapia tendem a ser “agressivos”, lisando as culturas bacterianas, deve ser determinada a taxa de adsorção, o *burst size*, e o período de latência destes; (ii) Após

a inoculação do fago, este deverá se multiplicar/aumentar de acordo com o tamanho da população bacteriana infectante (uma das diferenças entre eles e os antibióticos está na necessidade de múltiplas doses destes últimos, criando-se, por conta disso uma ‘janela terapêutica’); (iii) Embora os fagos sejam auto replicativos, uma dose inicial deve ser obedecida para controlar a população bacteriana antes que esta alcance um limite letal; (iv) A virulência da bactéria também deverá ser analisada, pois isto poderá exigir uma dose mais alta de fagos ou mesmo a utilização de fagos mais virulentos. A criação de modelos terapêuticos para o uso de fagos também instigou Payne & Jansen (2001). De acordo com estes autores, os fagos também devem ser eliminados pela interação com o organismo do indivíduo, como por exemplo pela interação do sistema reticulo endotelial, do sistema imune inato.

3.9.4 Fago M13: estrutura e mecanismo de infecção

O fago M13 é um fago filamentososo da família *Inoviridae* que infecta *E. coli*, após ligar-se ao pilus sexual dessa bactéria. Este fago apresenta um genoma circular de DNA fita simples. Seguindo com a infecção, no interior da bactéria, M13 se utiliza da maquinaria bioquímica desta para converter seu DNA circular fita simples em fita dupla (fase replicativa do fago) e iniciar a transcrição de seus genes. A transcrição dos genes de M13 produz enzimas e proteínas que culminarão com a formação de novas partículas do vírion, assim como auxiliarão o mesmo a sair de *E. coli*, para colonizar outras bactérias. O fago M13 não é lítico, portanto, as novas partículas virais sairão de *E. coli* por extrusão, não ocasionando o rompimento da célula. Durante a fase de infecção, a bactéria sofre um retardo em seu crescimento normal; ela continua a crescer e dividir-se, só que em uma condição significativamente mais lenta do que uma célula não infectada (MATSUZAKI *et al*, 2005; WAN & GODDARD, 2012).

De acordo com Marvin (1998), Webster (2001), Deng & Perham (2002) e Arap (2005), o fago M13 tem aproximadamente 1µm de comprimento e 6nm de diâmetro (figura 12). A partícula de M13 (vírion) abriga seu genoma circular de DNA fita simples dentro de um capsídeo tubular, formado por cerca de 2.700 cópias da principal proteína deste envoltório, a proteína pVIII.

Nas duas extremidades do capsídeo de M13 existem dois pares diferentes de pequenas proteínas, cada par está presente em três a cinco cópias por vírion. O par de

proteínas pVII e pIX, de uma das extremidades, é tido como o ponto de início para a construção/organização do capsídeo de M13, no interior de *E. coli*. O outro par de proteínas, pIII e pVI, está presente na extremidade oposta e marca o fim da elongação do capsídeo viral dentro da bactéria (DENG & PERHAM, 2002; ARAP, 2005; PANDE *et al*, 2010) (figura 12).



Figura 12. Estrutura do fago M13. As proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX compõem a estrutura do capsídeo. As proteínas usadas para a apresentação de bibliotecas de peptídeos são ou a pIII ou a pVIII.

Fonte: Arap (2005)

A infecção de *E. coli* por M13 começa com a ligação da pIII do capsídeo deste fago à ponta do pilus sexual da bactéria. Em seguida, há uma retração do pilus e translocação do genoma viral para dentro da célula bacteriana (DENG & PERHAM, 2002; CHEN *et al*, 2010).

A proteína pIII apresenta três domínios distintos, D1, D2 e D3, que compreendem 67, 131, e 121 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Estes três domínios são independentes e separados uns dos outros por duas seqüências peptídicas ricas em glicina, que atua como um *link* entre os domínios. A proteína pIII também possui uma região hidrofóbica na porção final

de sua extremidade C-terminal, a qual atua como uma “âncora” durante a montagem do capsídeo do fago, no interior da bactéria. O processo de translocação do DNA do fago requer a interação de D1 com o domínio C-terminal da proteína TolA (uma proteína da membrana celular interna de *E. coli*) (CLICK & WEBSTER, 1997; LUBKOWSKI *et al*, 1999; DENG & PERHAM, 2002; CHEN *et al*, 2010; LORENZ *et al*, 2011).

De acordo com Riechmann & Holliger (1997), Lubkowski *et al* (1998) e Lorenz *et al* (2011), os domínios D1 e D2 interagem entre si mesmo antes de D1 se ligar a TolA. Inicialmente D2 é necessário para uma interação fraca com o pilus de *E. coli*, seguido de uma interação mais forte entre o restante de pIII e o pilus; esta interação mais forte, que surge em um segundo momento, pode mesmo ser entre o próprio D2 com o pilus ou simplesmente o bi-domínio D1-D2.

O pilus sexual F (também conhecido como pilli sexual, fimbria F, fimbria sexual, ou ainda fator de fertilidade F) ocorre em cepas de *E. coli* F⁺. Estas cepas são portadoras do plasmídeo F (ou fator de fertilidade), que pode existir na forma extracromossomal (plasmídeo) ou ainda integrado ao genoma de *E. coli*, convertendo esta em uma célula Hfr (alta frequência de recombinação). O pilus sexual é uma longa estrutura extracelular filamentosa, com um diâmetro central de 2nm, sendo que o diâmetro de saída é de 8nm; o lúmen do pilus F é hidrofóbico. A função do pilus sexual F é promover a transferência de genes de uma *E. coli*, portadora do plasmídeo F (F⁺), para outra *E. coli*, não portadora deste plasmídeo sexual (F⁻). Os genes transferidos de uma *E. coli* a outra são carregados pelo plasmídeo F e geralmente são genes que apresentam resistência (ou multiresistência) a antibióticos. O comprimento do pilus sexual varia entre 1 e 20µm, pois é dependente as condições de crescimento da bactéria. O pilus F é resultado da reunião de múltiplas cópias da proteína estrutural “pilina F” (PARANCHYCH & FROST, 1988; FROST *et al*, 1994; DENG & PERHAM, 2002).

De acordo com Deng & Perham (2002) e Arutyunov *et al* (2010), a propilina F, precursora da pilina-F em *E. coli*, é codificada pelo gene *traA* e é maturada em pilina-F (70 resíduos) através da proteína TraQ, e também por meio de uma acetilação no seu resíduo N-terminal, pela proteína TraX. Por meio da análise da seqüência de DNA, descobriu-se que a diferença entre o pilus sexual F e outros tipos de pilus que apresentam semelhança com o pilus F (pilus tipo I-IV) está na seqüência primária das regiões N- e C-terminal destes últimos. Especificamente é a porção N-terminal da pilina F que tem a capacidade de se ligar aos fagos filamentosos, como M13 e f1, além de ser o principal epítipo para anticorpos.

3.10 Plasmídeo F, “Ilhas de Patogenicidade” em *E. coli* e Perspectivas do Fago M13 para a Fagoterapia

De acordo com Firth *et al* (1996), o plasmídeo F é uma tipo de molécula de DNA circular, com 100 kb de tamanho. Este plasmídeo é um “protótipo” de um grande grupo de plasmídeos conjugativos conhecidos coletivamente como “plasmídeos semelhantes a F”. A relação destes plasmídeos foi inicialmente indicada por meio de similaridade morfológica e sorológica dos pilus que eles expressavam e da sensibilidade aos bacteriófagos que eles conferiam. Os “plasmídeos semelhantes a F” estão subdivididos em sete grupos, de acordo com um grau de incompatibilidade (‘Inc’), IncFI – IncFVII (FIRTH *et al*, 1996; FILOUX, 2010). Esta incompatibilidade que os separa em grupos está associada com o(s) replicon(s) do plasmídeo. O replicon é um termo que se dá a um plasmídeo auto transmissível ou conjugativo, ou ainda, ao(s) próprio(s) sistema(s) de transferência contido(s) no plasmídeo conjugativo.

Os “plasmídeos semelhantes a F” são clinicamente importantes, pois apresentam determinantes importantes que incluem desde genes de resistência a antibióticos, hemolisinas, toxinas, a muitos produtos ecologicamente importantes, como exemplo a colicina (toxina protéica letal contra *E. coli* e outras bactérias entéricas relacionadas - CHEN *et al*, 2010). Os “plasmídeos semelhantes a F” são encontrados ao longo da família *Enterobacteriaceae* (JOHNSON *et al*, 2009). Existem outros plasmídeos conjugativos na família *Enterobacteriaceae* e no gênero *Pseudomonas* que não são enquadrados como “plasmídeos semelhantes a F” e são classificados de acordo com outros parâmetros de incompatibilidade. Estes dois grupos de plasmídeos pertencem a duas famílias evolucionárias distintas. Enquanto o grupo de “plasmídeos relacionados a F” expressa pilus longos, flexíveis, são pontes de transferência eficientes em culturas líquidas, estão freqüentemente associados como portas de infecção pelos f1 (M13, fd) e/ou sensitivos ao J (exemplos: o complexo IncF, e os plasmídeos IncD, IncC e IncJ), o segundo grupo produz pilus curtos, rígidos, transferem eficientemente melhor em células sobre superfícies sólidas e, freqüentemente conferem resistência aos fagos PR4 e/ou X (exemplo: os plasmídeos IncP, IncW, IncN e IncI) (FIRTH *et al*, 1996; FILOUX, 2010).

De acordo com Schubert *et al* (2009), a diversidade bacteriana é causada por vários mecanismos genéticos incluindo mutações pontuais, rearranjos genéticos e transferência horizontal de genes; todas representam forças que dirigem a evolução bacteriana. Enquanto

mutações pontuais e rearranjos genéticos direcionam para o desenvolvimento de uma evolução lenta, sem a criação de um novo determinante genético, a transferência horizontal de genes produz uma mudança extrema no genoma da célula. Neste último caso, uma concentração substancial de DNA é introduzida dentro da célula e/ou retirado do cromossomo. Isto é particularmente verdade para patógenos bacterianos, onde genes de virulência são transferidos de uma espécie a outra, caracterizando um estilo próprio destes microrganismos para vencer as barreiras impostas pelo organismo frente às infecções. A transferência horizontal de genes inclui grandes porções de DNA genômico, transportados por plasmídeos e fagos, e geralmente inclui regiões conhecidas como “ilhas de patogenicidade”. Estas ilhas de patogenicidade são importantes no processo que direciona, em um único passo, novos “patótipos” bacterianos, pois transformam um organismo normal em um patógeno. Schubert *et al* (2009) ainda relata que os mecanismos subjacentes a mobilidade, a transferência e a evolução dessas “ilhas de patogenicidade” são ainda pouco entendidas dentro de uma espécie bacteriana.

Schubert *et al* (2000) e Schubert *et al* (2009) ainda cita a existência de “ilhas de alta patogenicidade” (IAP), como modelo para se determinar as “ilhas de patogenicidade comuns”. As “ilhas de alta patogenicidade” foram primeiramente detectadas em espécies altamente virulentas de *Yersinia pestis*. Interessantemente, uma IAP ortóloga, altamente conservada, está distribuída entre deferentes espécies do gênero da família *Enterobacteriaceae*. De acordo com Schubert *et al* (2009), toda a estrutura da IAP revelou ser esta uma típica área isolada de patogenicidade: (i) ela está integrada a um gene de tRNA (*asn* tRNA), (ii) carrega um gene para uma “integrase do tipo fago” e (iii) apresenta um conteúdo G-C distinto daquele observado para a estrutura básica normal do cromossomo de *E. coli*. Esta IAP é constituída pelos genes de patogenicidade *int*, *ybtQ*, *ybtA*, *irp2*, *irp1* e *fyuA*. De acordo com, Schubert *et al* (2002), Kaper *et al* (2004) e Schubert *et al* (2009) estudos tem mostrado que IAP estão fortemente associadas com *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC), as quais causam infecções humanas como septicemia, meningite, infecções do trato urinário e peritonite. De acordo com Kaper *et al* (2004), a ocorrência de meningite e sepsé causada por *E. coli* extraintestinal vêm aumentando significativamente.

As espécies de *E. coli* compreendem as cepas não patogênicas, cepas comensais, pertencentes a microbiota intestinal normal de humanos e de muitos animais, e as cepas patogênicas, as quais causam diferentes tipo de infecções intestinais e extra-intestinais em homens e animais (BÉLANGER *et al*, 2011). De acordo com Schubert *et al* (2009), os mecanismos envolvidos com a patogenicidade de ExPEC têm sido analisados em detalhes por muito anos. A informação genética destes fatores de virulência tem sido largamente adquirida

por transferência horizontal de genes. Os “elementos chaves” dessa transferência horizontal são fragmentos largos de DNA, chamados ilhas genômicas, e estão integradas dentro de regiões cromossomais conservadas de *E. coli* (SCHUBERT *et al*, 2009).

No experimento realizado por Schubert *et al* (2009) foi demonstrado que a IAP composta pelos genes *int*, *ybtQ*, *ybtA*, *irp2*, *irp1* e *fyuA* não é somente transmitida por meio de transferência vertical (clonal), mas também através de transferência horizontal. Schubert *et al* (2009) ainda destaca que a transferência de regiões contendo genes de patogenicidade envolveu também a transferência de grandes regiões à montante e a jusante destes blocos de genes e que o principal agente responsável por essa transferência horizontal, entre diferentes cepas de *E. coli*, é o plasmídeo F (ou plasmídeo sexual). Esta transferência ocorre por meio da integração dessas regiões de DNA genômico ao plasmídeo F com a posterior mobilização do mesmo para outra linhagem de *E. coli*, por meio do evento de conjugação. É importante lembrar que o próprio plasmídeo F organiza o aparato de conjugação, por meio da formação do pilus sexual. Deste modo, em um único evento de conjugação, o plasmídeo F é capaz de transferir estas ilhas de patogenicidade de uma cepa extra-intestinal patogênica até outra não patogênica, transformando-a, por conseguinte, em patogênica.

De acordo com Wan & Goddard (2012), a transferência horizontal de genes inter- ou intra- espécies é um poderoso mecanismo para a plasticidade do genoma bacteriano. Experimentos realizados por Wan & Goddard (2012) concluíram que, apesar de o fago M13 infectar *E. coli* F⁺ pela extremidade do pilus sexual, este processo não foi capaz de inibir processo de conjugação bacteriana desta espécie. Mesmo na presença de grande quantidade de fago, foi demonstrado que a conjugação bacteriana prevaleceu sobre a pressão exercida pela susceptibilidade a este.

Lin *et al* (2011) também reitera que a transferência horizontal de genes é a principal modo de espalhar a resistência a antibióticos. Contudo, nos experimentos de Lin *et al* (2011), estes autores demonstraram ser possível inibir totalmente a conjugação de uma *E. coli* com uma concentração alta de fagos M13. Esta conjugação envolvia um plasmídeo F contendo o gene de resistência à tetraciclina. Eles sugeriram que a proteína g3p (ou p3, como também é conhecida) saturada pode competir com o pilus sexual, impedindo que este se ligue de forma adequada à *E. coli* F⁻. Lin *et al* (2011) ainda comentam que muitos fatores de resistência aos antibióticos podem conferir uma maior susceptibilidade da bactéria por fagos filamentosos, que se utilizam do pilus sexual para infectar as bactérias. Por conta disso, os autores levantam a importância do fago M13 enquanto agente potencialmente capaz de inibir a proliferação de genes de resistência em cepas de *E. coli* extraintestinais. Como os resultados obtidos por Lin

et al (2001) diferem dos resultados de Wan & Goddard (2012), novos experimentos devem ser realizados a fim de esclarecer o efeito da competição do fago M13 na conjugação de *E. coli*.

Por fim, tendo por base todo o subsídio teórico exposto, pensamos ser possível que a utilização das DNazimas, enquanto promissores agentes terapêuticos, aliada ao potencial uso dos fagos, em especial M13, representam metodologias importantes e inovadoras a serem exploradas e somadas à terapia antimicrobiana. Utilizar, portanto, o fago M13 para veicular um sistema de expressão de DNazimas letais para *E. coli* portadoras de pilus sexual, e que têm a habilidade de transferir genes de resistência à outras bactérias, colaboram para este desenvolvimento. Isto se torna ainda mais importante na atual conjuntura, em que a fagoterapia reascende, especialmente como alternativa para o combate de bactérias super e multirresistentes

■ ■ ■



MATERIAL



4.1 Meios para Cultivo

✓ **Meio LB (Luria-Bertani) Líquido:**

- Peptona bacteriológica 1,0% (p/v)
- Extrato de levedura 0,5% (p/v)
- NaCl 1,0% (p/v)
- H₂O q.s.p

pH 7.5 (ajustado com NaOH)

Utilização: Meio de cultura para crescimento de linhagens bacterianas

✓ **Meio LB (Luria-Bertani) Ágar:**

- Peptona Bacteriológica 1,0% (p/v)
- Extrato de Levedura 0,5% (p/v)
- NaCl 1,0% (p/v)
- Agar bacteriológico 1,5% (p/v)
- H₂O destilada q.s.p.

pH 7.5 (ajustado com NaOH)

Utilização: Meio de cultura para crescimento de linhagens bacterianas

✓ **Meio LB (Luria-Bertani) Top Ágar:**

- Peptona Bacteriológica 1,0% (p/v)
- Extrato de Levedura 0,5% (p/v)
- NaCl 1,0% (p/v)
- Agar bacteriológico 0,7% (p/v)
- H₂O destilada q.s.p.

pH 7.5 (ajustado com NaOH)

Utilização: Meio de cultura para crescimento de linhagens bacterianas após transfecção por bacteriófagos, utilizado para análise de UFP (unidade formadora de placa)

✓ **Meio SB - *Super Broth*:**

- Peptona Bacteriológica 3,0% (p/v)
 - Extrato de Levedura 2,0% (p/v)
 - MOPS 1,0% (p/v)
 - H₂O destilada q.s.p.
- pH 7.0 (ajustado com HCl)

Utilização: Meio de cultura para crescimento de linhagens bacterianas transfectadas por bacteriófagos, utilizado para amplificação de fagos.

✓ **Meio SOB - *Super Optimal Broth*:**

- Peptona Bacteriológica 2,0% (p/v)
 - Extrato de Levedura 0,5% (p/v)
 - NaCl 0,05% (p/v)
 - KCl 0,00186% (p/v)
 - H₂O destilada q.s.p.
- pH 7.0 (ajustado com HCl)

Utilização: Meio de cultura para crescimento de linhagens bacterianas

✓ **Meio MacConkey (Difco[®])**

Utilização: Meio de cultura destinado ao crescimento de bactérias Gram negativas e indicar a fermentação de lactose. Colônias bacterianas que fermentam lactose tornam o meio “rosa choque” e as bactérias que não são fermentadoras de lactose tornam o meio amarelo claro.

✓ **Meio Agar Nutriente (HMEDIA[®])**

Utilização: Meio de cultura utilizado no cultivo de microorganismos menos exigentes (não fastidiosos), pode ser enriquecido com sangue ou outros fluídos biológicos.

✓ **Meio BHI Ágar - *Brain Heart Infusion* (HMEDIA[®])**

Utilização: Meio de cultura de utilização geral, adequado para a cultura de uma grande variedade de tipos de organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos provenientes de amostras clínicas.

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C, por 15 minutos. A seguir, em temperatura de aproximadamente 55 °C, adicionava-se o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina ou kanamicina, nas concentrações finais indicadas a seguir (seção 4.3).

4.2 Antibióticos

✓ **Ampicilina:**

Utilização: adicionada ao meio líquido ou sólido na concentração de 100µg/mL para crescimento seletivo de *E. coli* transformantes contendo como marcador de resistência o gene da β-lactamase. Durante a seleção de transformantes, após eletroporação ou por choque térmico, este antibiótico foi usado na concentração de 200µg/mL, para impedir o crescimento de colônias “piratas” e atenuar a elevada densidade bacteriana durante a sementeada.

✓ **Kanamicina:**

Utilização: adicionada ao meio líquido ou sólido, na concentração de 50µg/mL, para crescimento seletivo da linhagem *E. coli* DH5αF'Iq e do fago *helper* **VCSM13**, que apresentam resistência intrínseca à kanamicina.

4.3 Linhagens Celulares

✓ ***E. coli* BL21(DE3):** F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

- ✓ ***E. coli* DH5 α** : F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ -.
- ✓ ***E. coli* DH5 α F'Iq**: F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1/F'* *proAB+* *lacIqZ* Δ M15 *zzf:Tn5* [KmR].
- ✓ ***E. coli* DH10b**: F⁻ *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL* Δ *lacX74* Φ 80*lacZ* Δ M15 *araD139* Δ (*ara,leu*)7697 *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) λ ⁻
- ✓ ***E. coli* JM109**: *endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB*⁺ Δ (*lac-proAB*) *e14-* [F' *traD36 proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15] *hsdR17*(rk⁻mk⁺)
- ✓ ***E. coli* K-12 MG1655**: Genotype: F- *lambda-* *ilvG-* *rfb-50 rph-1*
- ✓ ***E. coli* TOPO 10 (Invitrogen)**: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX174 recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*.*

4.4 Plasmídeos

- ✓ **pGEM®-T Easy Vector (PROMEGA)**: vetor de clonagem (figura 13). Neste trabalho, o mesmo também foi utilizado como substrato para a amplificação, por PCR, da região *Ori fl*.

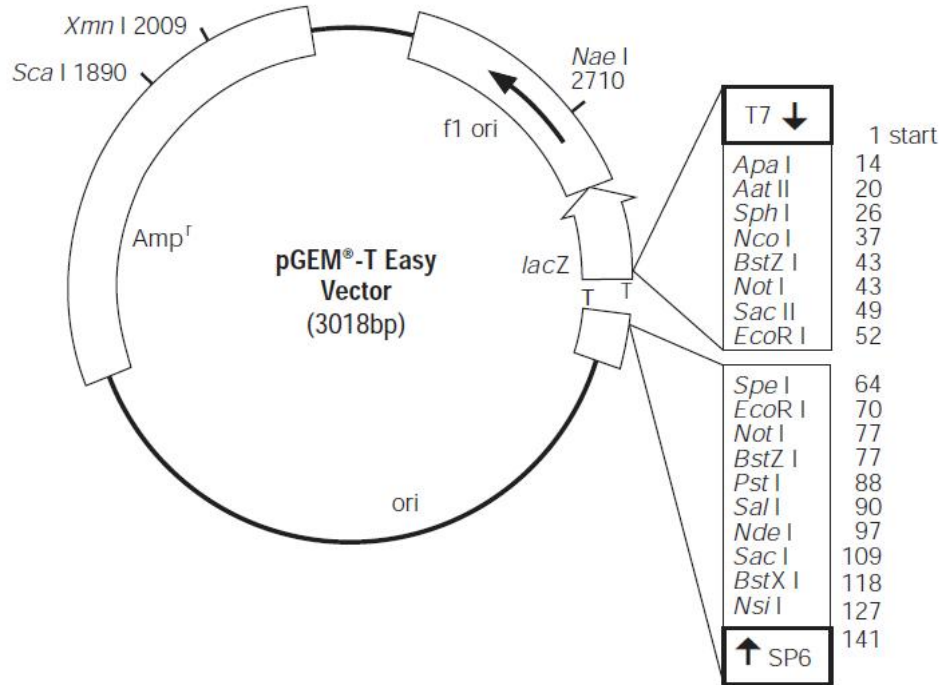


Figura 13 . Vetor pGEM®-T Easy

Fonte: kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).

- ✓ **pRT 30-2:** Vetor de expressão para a transcriptase reversa do vírus da leucemia de ratos Moloney (MoMuLV-RT) (figura 14), gentilmente cedido pelo prof. Dr. Stephen Goff – *Columbia University* (ver termo de utilização e doação de material em **APÊNDICE 1** e **APÊNDICE 2**). De acordo com o prof. Goff, a expressão de MoMuLV-RT ocorre constitutivamente, por meio do promotor A1 (pA1), do fago f1, e a estrutura básica do vetor, a região compreendida entre *HindIII* e *BamHI* (contendo os terminadores de transcrição bacteriana, origem de replicação e marcador de seleção), é basicamente a mesma porção dos plasmídeos pKK.

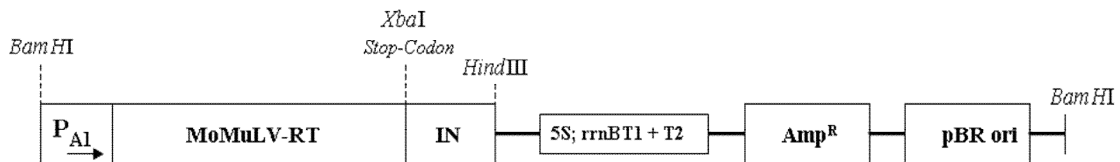


Figura 14. Esquema linearizado do vetor pRT 30-2, de acordo como enviado pelo Dr. Stephen Goff - *Columbia University* (Apêndice 1)

Fonte: Prof. Dr. Stephen Goff - *Columbia University* (APÊNDICE 1).

- ✓ **pUC19-plac-ftsZ**: vetor de clonagem, baseado em pUC19, contendo o cassete para a expressão da DNazima *ftsZ* (*Dz-ftsZ*) (figura 15). Este cassete é regulado pelo promotor *lac* e foi sintetizado quimicamente por *Genone Biotechnologies*®.

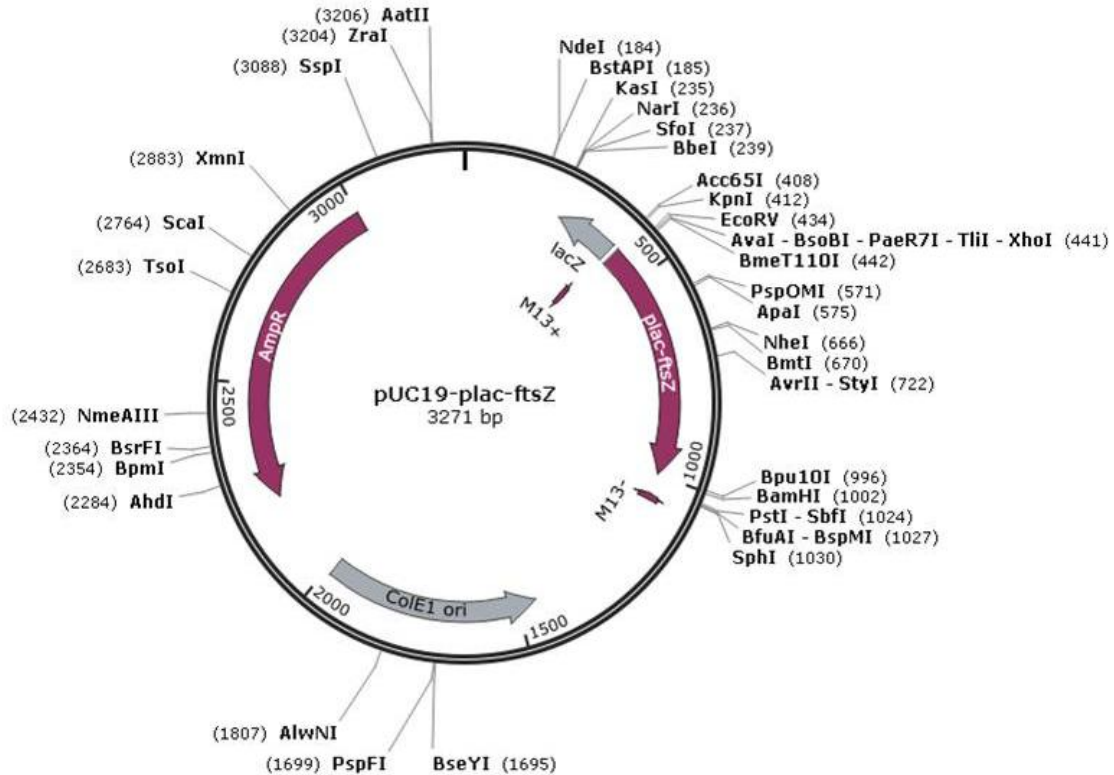


Figura 15. Vetor pUC19-plac-ftsZ.

Fonte: Redesenhado, por *SnapGene*® *Viwer* v. 1.5.3, a partir da seqüência completa do vetor, enviada por *Genone Biotechnologies*®.

4.5 Fago Helper

- ✓ **VCSM13 (Stratagene® # 200251)**: Derivado do bacteriófago M13 com gene II mutado; origem de duplicação plasmidial derivada do p15 e gene de resistência à kanamicina.

4.6 Oligonucleotídeos Iniciadores para PCR

Neste trabalho, com exceção de SP6 e T7 (*Invitrogen*®), todos os demais dos oligonucleotídeos iniciadores foram previamente desenvolvidos (desenhados) e

encomendados via síntese química, na condição “dessalinizada” (Quadro 1). Os pares alr-ECI/alr-ECII e dadX-ECI/dadX-ECII foram sintetizados por *Bioneer*® e o par Orif1-F/Orif1-R foi sintetizado por *Alpha DNA*®.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores usados em PCR.

| <i>Primes</i> | Seqüência 5' → 3' | Produto amplificado | Tamanho (PB) |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------------|--------------|
| alr-ECI | AGGGCCCCAAGCGGCAACTGTTGTG | ORF de <i>alr</i> , em <i>E. coli</i> | 1.080 |
| alr-ECII | AGTCGACTTAATCCACGTATTTTCATCGC | | |
| dadX-ECI | AGGGCCCACCCGTCCGATACAGGC | ORF de <i>dadX</i> , em <i>E. coli</i> | 1.071 |
| dadX-ECII | AGTCGACTTACACCGTCACAACCGG | | |
| Orif1-F | ACTCGAGAAATTGTAAACGTTAATATTTTG | Ori <i>fl</i> , em pGEM®-T Easy | 455 |
| Orif1-R | AGAATTCAATGGACGCGCCCTGTAGC | | |
| SP6 | ATTTAGGTGACACTATAG | Insero clonado, em pGEM®-T Easy | ? |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG | | |

4.7 DNazimas para Ensaios Cinéticos

As DNazimas desenvolvidas (desenhadas) para este trabalho (Quadro 2) foram obtidas por síntese química, na condição “dessalinizada”. As DNazimas Dz_{alr-I} e Dz_{dadx-I} foram sintetizadas por *Integrated DNA Technologies*® (IDT) e Dz_{alr-II} e Dz_{dadx-II}, por *Genone Biotechnologies*®.

Quadro 2. DNazimas utilizadas em ensaios cinéticos.

| Oligonucleotídeos | Seqüência 5' → 3' | Alvo da DNazima |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
| Dz _{alr-I} | CAATCAGGGGCTAGCTACAACGATGGAGGTT | RNA do gene <i>alr</i> de <i>E. coli</i> |
| Dz _{alr-II} | AATCGGTAGGCTAGCTACAACGATTCGCGAC | |
| Dz _{dadx-I} | AAGCGCCAGGCTAGCTACAACGAACAAAATA | RNA do gene <i>dadX</i> de <i>E. coli</i> |
| Dz _{dadx-II} | CTTTAAGAGGCTAGCTACAACGAAAATATCC | |

4.8 Cassete de Expressão de DNazimas

O desenho final do cassete para a expressão da DNazima *ftsZ* encerrou em 576 pb de comprimento, como mostrado na figura 16. **Este cassete é regulado por *plac* e transcreve uma molécula de RNA que servirá de substrato para a produção da DNazima *ftsZ*, por meio de uma transcrição reversa.** Em ambas as extremidades deste, foram inseridos os sítios de *HindIII*, para a devida inserção do mesmo em pRT 30-2. A presença de outros sítios para endonucleases de restrição também foram inseridos de modo a permitir manipulações necessárias dessa estrutura. Os sítios *ApaI*, *XbaI*, *AvrII* e *SalI* podem ser utilizados para retirar a DNazima *ftsZ*, desta forma, possibilitando a inserção de outras DNazimas de interesse. Todo esse cassete foi sintetizado quimicamente por *Genone Biotechnologies®* e clonado em PUC-19, formando pUC19-*plac-ftsZ*.

```

5' AAGCTT TC GAATTC GT GATATC ACT CTCGAG GGGCAGTGAGCGCAACGCA
   HindIII      EcoRI      EcoRV      XhoI
A TTAATGTGAGTTAGCTCACT CATTAGGCACCCCAGGC TTTACA CTTTATGCT
   Sítio de ligação à CAP - 35
TCCGGCTCG TATGTT GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAG AT
   - 10 Operador lac
GGGCC TCTAGA TAGCTTGAAGAGCGGCCGCACTCACGATAGAGTGGGAGAT
   ApaI XbaI Terminalizador de transcrição reversa
GGGCGCGAGAAAGTGC GGCCGCTCTTC CTGGATGATCGTTGTAGCTAGCCTTC
   Dz-ftsZ
GAAAC TTGGTGGTGCCTCCGAGTGGACCGGAGACCCCTGCTCGAC CCTAGG
   Sítio de ligação à MoMuLV-RT AvrII
GTCGAC TGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA TGAATCGG
   SalI
CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC GTATTGGGCGCTCTTCCGCTT CCTCGCT
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTA TCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC
ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC AAGCTT 3'
   HindIII

```

Figura 16. Cassete de expressão para a DNazima *ftsZ*.

4.9 Enzimas

4.9.1 Endonucleases de restrição

- ✓ ***Bam*HI (NEB #R0136T):** endonuclease de restrição
- ✓ ***Eco*RI (NEB #R0101L):** endonuclease de restrição
- ✓ ***Hind*III (NEB #R0104T):** endonuclease de restrição
- ✓ ***Apa*I (NEB #R0114L):** endonuclease de restrição
- ✓ ***Sal*I (NEB #R0138S):** endonuclease de restrição
- ✓ ***Xho*I (NEB #R0146L):** endonuclease de restrição

4.9.2 Enzimas de polimerização de nucleotídeos

- ✓ **GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega # M8295):** enzima de polimerização de DNA
- ✓ **RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas #EP0451):** enzima de transcrição reversa (polimerização de DNA a partir de um molde de RNA)

4.9.3 Outras enzimas

- ✓ **Shrimp Alkaline Phosphatase Tested User Friendly[™] (USB #70092X):** enzima de desfosforilação.

- ✓ **T4 DNA ligase (NEB# M0202S):** enzima de ligação fosfodiéster entre cadeias polinucleotídicas de DNA.
- ✓ **RNase OUT (Invitrogen):** enzima inibidora de RNase.
- ✓ **RNase A (Invitrogen):** Enzima de degradação de moléculas de RNA.

4.10 Marcadores Moleculares Padrões de Peso e Tamanho

- ✓ **Unstained Protein Molecular Weight Marker (Gene Ruler™ #SM0431):** marcador de peso molecular de proteína.
- ✓ **DNA Marker 1 Kb (Gene Ruler™):** marcador de tamanho molecular de DNA
- ✓ **1 Kb DNA Ladder (Jena Bioscience#M-217):** marcador de tamanho molecular de DNA
- ✓ **100 pb DNA Ladder (Jena Bioscience#M-214):** marcador de tamanho molecular de DNA

4.11 Testes Comerciais

- ✓ **Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®):** kit para extração de DNA plasmidial em pequena (miniprep) escala de *E. coli*.
- ✓ **Ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70):** kit para purificação de produtos de PCR e bandas em gel de agarose.
- ✓ **MEGAscript® T7 RNA Polymerase (AMBION®):** kit de transcrição *in vitro*

4.12 Soluções de Uso Geral

- ✓ **Tampão TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0.
- ✓ **Tampão TEN:** Tris-HCl 50mM, pH 8,0; EDTA 50mM, pH 8,0; NaCl 100mM.
- ✓ **Triton X-100 10%:** Triton X-100 10% em água deionizada (v/v).
- ✓ **SDS 10%:** SDS 10% (v/v).
- ✓ **Tampão R:** Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 7,5.
- ✓ **Solução de Glicose 25%:** Glicose anidra 25% (p/v) – esta solução foi esterilizada por autoclavagem a 120 °C, por 15 minutos, usada em meios de cultura glicosados.

4.13 Soluções Utilizadas em Ensaio Cinéticos com DNazimas

- **Tampão da Reação:** MgCl₂ 10 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7.5.
- **Solução de Parada da reação (*Stop-Solution*):** azul de bromofenol 0,3 %; xileno cianol 0,3 %; EDTA 10 mM, pH 7.5; Formamida deionizada 97,5 %.
- **Solução de Parada de Reação:** EDTA 0,5 M, pH 8.0.
- **dH₂O Nuclease Free:** DEPC 0,1 % (v/v).

4.14 Soluções Usadas para Eletroforese em Géis de Agarose e Poliacrilamida

4.14.1 Gel de agarose

- **Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TBE) 5X:** Tris-Base 0.089 M; Ácido Bórico 0.089 M; EDTA 0,02 M, pH 8,0.

- **Tampão de Carreamento da Amostra para Gel de Agarose:** Azul de Bromofenol 0,25% (p/v); Xileno Cianol 0,25% (p/v); Glicerol em H₂O 30%.

4.14.2 Gel de acrilamida para proteínas

- **Tampão de amostras para SDS-PAGE (Tris-HCl 0,125M; SDS 4%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol; azul de bromofenol 0,004%):** solução usada para a extração de proteínas celulares totais e carreamento destas, em eletroforese de proteínas

- **Tampão de Corrida SDS-PAGE:** Tris-Base 125mM; Glicina 960mM; SDS 0,5% (p/v). Ajustar para pH 8,3.

- **Tampão de Carreamento da Amostra para SDS-PAGE 2X:** Tris-HCl 62,50mM, pH 6,8; SDS 5% (p/v); Glicerol 25% (v/v); β-Mercaptoetanol 5% (v/v); Azul de Bromofenol 0,01% (p/v).

- **Gel Concentrador de Amostra SDS-PAGE:** Solução Acrilamida/Bis-acrilamida 30 % (29 acril : 1 bis-acril) → 5% (p/v); Tris-HCl 0.1 M, pH6,8; SDS 10% (p/v); 10% Persulfato de Amônio (p/v).

- **Gel de Separação de Amostra SDS-PAGE:** Solução Acrilamida/Bis-acrilamida 30 % (29 acril : 1 bis-acril) → 12% (p/v); Tris-HCl 1.5 M, pH8,8; SDS 10% (p/v); 10% Persulfato de Amônio (p/v).

- **Solução Corante para Gel SDS-PAGE:** Metanol 40% (v/v); Ácido Acético 10% (v/v); Comassie *Blue* (R-250) 1% (p/v).

- **Solução Descorante para Gel SDS-PAGE:** Metanol 40% (v/v); Ácido Acético 10% (v/v).
Nota: TEMED adicionado na quantidade de 2 μ L para cada 5mL de gel.

4.14.3 Gel de acrilamida para RNA

- **Tampão de Carreamento da Amostra para SDS-PAGE 2X:** TBE 2X; formamida 95% (v/v); xileno cianol 0,025% (p/v); azul de bromofenol 0,025% (p/v); EDTA 18 mM; 0,025% SDS (p/v).

- **Gel de Separação de Amostra SDS-PAGE:** Solução Acrilamida/Bis-acrilamida 40 % (19 acril : 1 bis-acril) \rightarrow 5% (p/v); TBE 1X; 10% Persulfato de Amônio (p/v).
Nota: TEMED adicionado na quantidade de 5 μ L para cada 5mL de gel.

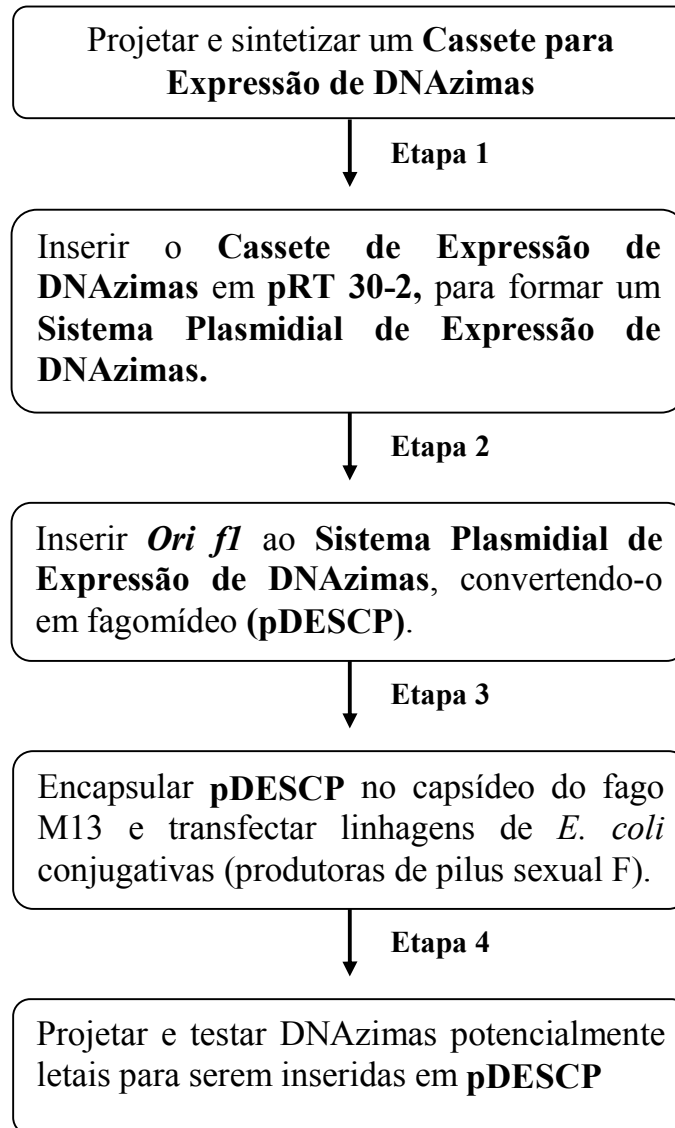
■ ■ ■



MÉTODOS



5.0 Estratégia Experimental



PARTE 1

Construção de um Sistema para Expressão de DNazimas em Plasmídeo

5.1 Sistema Plasmidial para Expressão de DNazimas

5.1.1 Construção do cassete de expressão de DNazimas

5.1.2 Vetor de expressão da transcriptase reversa: pRT 30-2

5.1.2.1 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

5.1.3 Ligação do cassete de expressão de DNazimas ao vetor pRT30-2

5.1.4 Análise da expressão de DNazimas



5.1 Sistema Plasmidial para Expressão de DNazimas

5.1.1 Construção do cassette para a expressão de DNazimas

A estrutura do cassette para a expressão de DNazimas (figura 16) apresenta, em sentido 5' →3', as seguintes regiões: (i) promotor *lac* (*plac*), ligado a um sítio de ligação à CAP e operador *lac*; (ii) terminalizador da transcrição reversa catalizada por MoMuLV-RT; (iii) a seqüência correspondente à DNazima *ftsZ* (*Dz-ftsZ*); (iv) o sítio de ligação a MoMuLV-RT; e (v) o terminalizador geral da transcrição do cassette regulado por *plac*.

A seqüência terminalizadora da transcrição reversa, à jusante do operador *lac*, foi adquirida de Li *et al* (2010). A DNazima escolhida para ser usada nesse cassette atua sobre o transcrito do gene *ftsZ*, de *E. coli*, e foi previamente projetada e validada por Tan *et al* (2004), assim como também a seqüência promotora para MoMuLV-RT, que é específica para funcionar em *E. coli*. O terminalizador geral de transcrição do cassette regulado por *plac* foi obtido a partir da mesma seqüência do terminalizador do cassette de expressão para a β galactosidase, contido em pGEM®-T Easy (*Promega*).

O vetor pUC19-*plac-ftsZ*, que contém o cassette de expressão para DNazima *ftsZ*, foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α F'Iq eletrocompetentes (ANEXO 1), de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 2. A seleção dos transformantes ocorreu em meio de cultura LB ágar, contendo ampicilina 200 μ g/mL, sendo esta cultura incubada em 37 °C, por 16h. Alguns clones transformantes foram selecionados e repicados em placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar com ampicilina 100 μ g/mL.

5.1.2 Vetor de expressão da transcriptase reversa: pRT 30-2

E. coli DH5 α F'IQ eletrocompetentes foram transformadas com o vetor pRT 30-2, conforme descrito no ANEXO 2. Os clones transformantes foram utilizados para a análise da expressão de MoMuLV-RT, de acordo como descrito pelo “protocolo de mini-indução”, no ANEXO 3.

5.1.2.1 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Realizou-se a extração de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-Prep) de *E. coli* DH5 α F'Iq transformada com pRT 30-2 e com pUC19-plac-ftsZ. Uma colônia jovem (~16 h) referente a cada clone foi cultivada em 5 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL. As culturas foram incubadas a 37 °C, por 16 h, em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, sob agitação de 180 rpm. A extração de DNA plasmidial foi realizada por meio do *kit* “ilustra™ plasmidPrep™ Mini Spin Kit” (GE Healthcare #28-9042-69), de acordo como preconizado pelo fabricante.

Após a extração de DNA plasmidial, uma alíquota de 2 μ L de cada amostra foi analisada por eletroforese em **gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo 0,5 μ g/mL. A eletroforese ocorreu sob condição de 3,5V/cm, por aproximadamente 1,5 h. O gel de agarose foi visualizado em um transiluminador, por emissão de luz UV (UVA e UVB), e fotografado por dispositivo de fotodocumentação.**⁴

5.1.3 Ligação do cassete de expressão de DNazimas ao vetor pRT30-2

O cassete para a expressão de MoMuLV-RT tem aproximadamente 2,4 kb de comprimento e é delimitado pelos sítios de restrição *Bam*HI, na extremidade 5'-P, e *Hind*III, na extremidade 3'-OH. A ORF desse gene apresenta dois sítios internos para *Bam*HI. Deste modo, tornou-se inviável a retirada desse cassete de dentro de pRT 30-2, por meio da digestão com *Bam*HI.

Com o objetivo de ligar o cassete de expressão da DNazima *ftsZ* ao vetor de expressão da transcriptase reversa foi realizada a digestão enzimática exaustiva, com *Hind*III, dos vetores pRT 30-2 e pUC19-plac-ftsZ. Para obtenção de massa, as reações de digestão de cada um dos vetores ocorreram em um volume de 50 μ L. As concentrações dos reagentes foram: tampão NEB 2 1X; *Hind*III 50 U; e 30 μ L (~ 8 μ g) de vetor (pRT 30-2 ou pUC19-plac-ftsZ, respectivamente). As reações foram incubadas a 37°C, durante 3,5 h e, em seguida, a enzima *Hind*III foi inativada a 65°C, durante 20min.

⁴ Nota: as condições de corrida eletroforética destacada em negrito, na seção 5.1.2.1, foram usadas para todos os géis de agarose produzidos neste trabalho, independente da concentração dos mesmos, assim como, também, o respectivo processo de captação de imagens!

L5.1 Construção de um Sistema para Expressão de DNazimas em Plasmídeo

Aproximadamente 45 μL da reação de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose *low melting* 0,8%, contendo brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A eletroforese ocorreu sob condição de 3,5V/cm, por aproximadamente 2 horas. Após este período, o gel foi rapidamente visualizado em um transiluminador, por emissão de luz UV (UVA e UVB), e os fragmentos referentes ao cassete de expressão da DNazima *ftsZ* e ao vetor pRT 30-2, ambos linearizados, foram excisados do gel, com auxílio de um bisturi estéril. Cada fragmento foi então acondicionado em um microtubo do tipo Eppendorf e purificados do gel de agarose por meio do kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70), de acordo como preconizado pelo fabricante. Posteriormente estes foram quantificados por meio de análise espectrofotométrica em 260nm, de acordo como descrito por Sambrook *et al* (1989).

Para evitar a religação de pRT 30-2 foi realizada a defosforilação do mesmo, utilizando-se a fosfatase alcalina de camarão. A reação ocorreu em um volume de 50 μL e as concentrações dos reagentes foram: tampão SAP 1X; SAP 20 U; 20 μL (~1,5 μg) de pRT 30-2. A reação foi incubada a 37°C, durante 2 h e, em seguida, a enzima SAP foi inativada a 65°C, durante 15 min. Após esta etapa, a massa do vetor defosforilado foi novamente quantificada (SAMBROOK *et al* 1989), para a reação de ligação. .

A reação química para o estabelecimento da ligação fosfodiéster entre o cassete de expressão da DNazima *ftsZ* e o vetor pRT 30-2 ocorreu em um volume de 10 μL . As concentrações dos reagentes foram: tampão de reação para T4 DNA ligase 1X; T4 DNA ligase 200 U; a relação molar entre inserto e vetor foi de 4:1, respectivamente. A concentração destes últimos foi determinada de acordo com a equação para reações de ligação envolvendo inserto e vetor, descrita nas instruções do teste pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). A reação foi incubada a 16 °C, durante 16 h. Todo o volume desta reação de ligação (10 μL) foi utilizado para transformar 50 μL de células *E. coli* DH5 α F'IQ quimiocompetentes (ANEXO 4), de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 5. A seleção dos transformantes ocorreu em meio LB ágar, contendo ampicilina 200 $\mu\text{g/ml}$, sendo a cultura incubada em 37 °C, por 16 h.

Um total de 8 clones transformantes foram obtidos a partir do sistema de ligação entre pRT 30-2 e o cassete de expressão para a DNazima *ftsZ*. Posteriormente, cada um destes clones foram cultivados em 5 mL de meio LB contendo ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ e incubados a 37°C, por 16h, em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, sob agitação de 180 rpm. A extração de DNA plasmidial de cada cultura foi realizada por meio do kit “ilustra™

plasmidPrep™ Mini Spin Kit” (GE Healthcare #28-9042-69), de acordo como preconizado pelo fabricante. Após esta extração, uma alíquota de 2 µL de cada uma das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1

Para a confirmação da ligação do inserto ao vetor foi realizada a digestão enzimática do DNA plasmidial de cada um dos oito clones com a enzima *HindIII*. Como controle positivo utilizou-se o vetor pRT 30-2, também digerido com *HindIII*. As respectivas reações ocorreram em um volume de 10 µL e as concentrações dos reagentes foram: tampão NEB-2 1X; *HindIII* 10 U; 3 µL (~ 0,5 ug) de Plasmídeo. As reações foram incubadas a 37 °C, durante 2 h e, em seguida, a enzima *HindIII* foi inativada a 65°C, durante 20 min. Todo o volume reacional (~ 10 µL) de cada amostra foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito no parágrafo anterior. O plasmídeo recombinante, resultante da ligação de pRT 30-2 com o cassete de expressão da DNazima *ftsZ*, foi denominado de pRT 30-2/Dz-*ftsZ*.

5.1.4 Análise da Expressão de DNazimas

Para a análise do sistema de expressão de DNazimas proposto, 2 µL de amostra contendo pRT 30-2/Dz-*ftsZ* foi utilizada para transformar 50µL de células *E. coli* DH5αF'IQ quimiocompetentes (ANEXO 4), de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 5.

A funcionalidade deste sistema foi verificada de duas maneiras: (i) análise do efeito causado em *E. coli* por uma possível ação da DNazima *ftsZ* produzida e (ii) análise da expressão desta DNazima.

Para a análise do efeito da DNazima *ftsZ*, um clone foi crescido tanto em meio LB líquido quanto em LB sólido, ambos contendo ampicilina 100 µg/mL e IPTG 1 mM, sendo a cultura incubada a 37°C, por 16h. O crescimento em LB líquido ocorreu em um volume de 5 mL deste meio, contidos em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, sob agitação contínua de 180 rpm. Após este período foram preparadas lâminas microscópicas das culturas. Estas últimas foram fixadas rapidamente pelo calor, utilizando-se, para isto, a chama de um “bico de Bunsen”, de modo semelhante à fixação que antecede a coloração pela técnica de GRAM. Depois de fixadas, as lâminas foram coradas com safranina durante 45 segundos e, em seguida, lavadas rapidamente em água corrente, com a lâmina direcionada paralelamente

5.1 Construção de um Sistema para Expressão de DNazimas em Plasmídeo

ao fluxo de água. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e, em seguida, observadas ao microscópio óptico, em aumento de 1.000 vezes (utilizou-se óleo de imersão).

Para se verificar a expressão da DNazima *ftsZ*, procedeu-se de modo a analisar a presença desta molécula (ssDNA) junto ao extrato de RNA total, obtido do clone recombinante por meio do Trizol®, de acordo como preconizado por Mirochnitchenko *et al*, (1994) e Chen *et al*, (2003) (ver **ANEXO 6**). Após tratamento adequado com RNase, a amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 3%, contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL. A eletroforese ocorreu sob condição de 3,5V/cm, por aproximadamente 1,5 h. O gel foi visualizado em um transiluminador, por emissão de luz UV (UVA e UVB), e fotografado por dispositivo de fotodocumentação.

■ ■ ■

PARTE 2

Conversão do Vetor de Expressão de DNazimas em Fagomídeo

5.2. Conversão de pRT 30-2/Dz-ftsZ em Fagomídeo

5.2.1. Isolamento da região *Ori fl*

5.2.2 Ligação de *Ori fl* em pRT 30-2/Dz-ftsZ

5.2.2.1 Confirmação da ligação do inserto ao vetor

5.2.3 Análise da expressão de DNazimas em pDESCP

5.2.4 Curva de crescimento



5.2 Conversão de pRT 30-2/Dz-ftsZ em Fagomídeo

5.2.1 Isolamento da região *Ori fl*

A conversão de pRT 30-2/Dz-ftsZ em um fagomídeo consistiu unicamente na inserção, neste, da seqüência de replicação e empacotamento do fago fl (*Ori fl*). A região *Ori fl* tem 455 pb de comprimento e foi obtida a partir do vetor pG-EcoRI, por PCR. pG-EcoRI é vetor pGEM®-T Easy (Promega) ligado pelas extremidades EcoRI (ver figura 13). Toda a região *Ori fl* foi amplificada por meio dos oligonucleotídeos iniciadores Orif1-F e Orif1-R, desenhados para esta finalidade. Orif1-F apresenta em sua extremidade 5'-P um nucleotídeo de adenina e o sítio para a enzima de restrição *XhoI*. A extremidade 5'-P de Orif1-R apresenta uma adenina e o sítio para *EcoRI*. Estes sítios são necessários para a inserção de *Ori fl* em pRT 30-2/Dz-ftsZ, explicado mais adiante.

Para a averiguação empírica da melhor temperatura de anelamento para o par de iniciadores desenhados foi feito uma PCR com gradiente de temperatura. A reação ocorreu em um volume de 20µL e as concentrações dos reagentes foram: tampão GoTaq® Flexi 1X; MgCl₂ 2,0mM; dNTPmix 0,2mM; 10 pmoles para ambos os iniciadores Orif1-F e Orif1-R; GoTaq® DNA Polimerase (Promega) 1,5U; ~1ng de pG-EcoRI. As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 min; 30 ciclos de: 95°C por 40 seg, 55°C com G= ±5 por 40 seg, 72°C por um 1min; seguido de uma extensão final de 72°C por 5min; e 4°C ∞. As temperaturas utilizadas estão descritas no quadro 3, a seguir.

Quadro 3. PCR com gradiente de temperatura. Utilizado para a análise da melhor temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeos iniciadores Orif1-F e Orif1-R. Temperatura média inserida: 55 °C com G= ±5.

| Coluna | Temperatura °C | Coluna | Temperatura °C | Coluna | Temperatura °C |
|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|
| 1 | 49,0 | 5 | 52,8 | 9 | 58,6 |
| 2 | 49,3 | 6 | 54,3 | 10 | 59,8 |
| 3 | 50,2 | 7 | 55,7 | 11 | 60,7 |
| 4 | 51,4 | 8 | 57,2 | 12 | 61,0 |

5.2 Construção de um fagomídeo de expressão de DNazimas

Após análise da melhor temperatura de anelamento, uma nova reação PCR foi feita para a obtenção de grande quantidade de massa do amplicon contendo a região *Ori fl*. A reação ocorreu em um volume de 50 µL. As concentrações dos reagentes e condições de termociclagem seguiram a mesma descrita para a PCR com gradiente de temperatura, mas agora se utilizando a temperatura de anelamento ótima de 58 °C. Uma alíquota de 5 µL da amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1. A massa de amplicon contido no restante reação de PCR foi purificada por meio do kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. O material foi posteriormente quantificado por análise espectrofotométrica em 260nm, de acordo como descrito por Sambrook *et al* (1989).

5.2.2 Ligação de *Ori fl* em pRT 30-2/Dz-ftsZ

Para que o amplicon contendo *Ori fl* (inserto) pudesse ser ligado ao vetor pRT 30-2/Dz-ftsZ, ambos foram independentemente digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Estes dois sítios de restrição estão estrategicamente contidos dentro do cassete de expressão para a DNazima *ftsZ* (figura 16), de modo que *Ori fl* pudesse ser inserida.

A primeira digestão, de ambos os substratos, ocorreu em um volume de 50 µL. As concentrações dos reagentes foram: tampão *EcoRI* 1X; *EcoRI* 50 U; na digestão de pRT 30-2/Dz-ftsZ, utilizou-se ~ 4,7 µg deste vetor; na digestão do amplicon contendo *Ori fl*, utilizou-se ~ 2 µg deste. Ambas as reações foram incubadas a 37°C, durante 3,5 h e, em seguida, a enzima *EcoRI* foi inativada a 65°C, durante 20min. Os produtos de digestão foram purificados por meio do kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. O vetor pRT30-2 foi, em seguida, analisado em gel de agarose 0,8% (conforme descrito na seção 5.1.2.1), para a constatação de seu estado linear. Ambos os produtos foram quantificados por análise espectrofotométrica em 260nm (SAMBROOK *et al*, 1989) para, em seguida, serem submetidos a 2ª etapa de digestão.

A segunda digestão também ocorreu em um volume de 50 µL, para ambos os substratos. As concentrações dos reagentes foram: tampão NEB-4 1X; *XhoI* 50 U; na digestão de pRT 30-2/Dz-ftsZ, utilizou-se ~3 µg deste vetor; na digestão do amplicon contendo *Ori fl*,

5.2 Construção de um fagomídeo de expressão de DNazimas

utilizou-se ~1,2 µg deste. As reações foram incubadas a 37°C, durante 3,5 h⁵. O produto de cada reação foi separado por eletroforese em gel de agarose “low melting” 0,8%, contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL. A eletroforese ocorreu sob condição de 3,5V/cm, por aproximadamente 2 horas. Após este período, o gel foi rapidamente visualizado em um transiluminador, por emissão de luz UV (UVA e UVB), para que o vetor pRT 30-2/Dz-ftsZ linearizado e *Ori fl* pudessem ser excisados do gel, com auxílio de um bisturi estéril e, em seguida, acondicionados, cada, em um microtubo do tipo Eppendorf. Ambos os produtos de digestão foram purificados do gel por meio do *kit* ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70). Após isto, ambos foram devidamente quantificados por análise espectrofotométrica em 260nm (SAMBROOK *et al*, 1989).

A reação de ligação entre *Ori fl* e pRT 30-2/Dz-ftsZ foi realizada em um volume de 15 µL e as concentrações dos reagentes foram as seguintes: tampão de ligação T4 DNA ligase (contendo ATP 10 mM) 1X; T4 DNA ligase 200 U; a relação molar entre inserto e vetor foi de 4:1, respectivamente. A concentração destes últimos foi determinada de acordo com a equação para reações de ligação, descrita no *kit* comercial pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). A reação foi incubada a 16 °C, durante 16 h. Todo o volume da reação de ligação ocorrido entre pRT 30-2/Dz-ftsZ e *Ori fl* foi utilizado para transformar 50 µL de *E. coli* DH5αF'IQ quimiocompetente (ANEXO 4), de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 5. A seleção dos transformantes ocorreu em meio LB ágar, contendo ampicilina 200 µg/mL, sendo o meio incubado a 37°C, por 16h.

5.2.2.1 Confirmação da ligação do inserto ao vetor

Um total de 5 clones transformantes foram obtidos a partir do sistema de ligação entre pRT 30-2/Dz-ftsZ e *Ori fl*. Posteriormente, cada um destes clones foram cultivados em 5 mL de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL e incubados a 37°C, por 16h, em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, sob agitação de 180 rpm. A extração de DNA plasmidial foi realizada por meio do kit “ilustra™ plasmidPrep™ Mini Spin Kit” (GE Healthcare: #28-9042-69), de acordo como preconizado pelo fabricante. Após a extração plasmidial, uma

⁵ A enzima *XhoI* não pode ser inativada pelo calor, como ocorre para a maioria das enzimas de restrição.

alíquota de 2 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1.

Para a confirmação da ligação do inserto ao vetor, o plasmídeo recombinante foi digerido unicamente com *HindIII* e, duplamente, com *EcoRI* e *XhoI*. Como controle positivo utilizou-se o vetor pRT 30-2 e pRT 30-2/Dz-ftsZ, ambos digeridos com *HindIII*.

As reações de digestão envolvendo *HindIII* ocorreram de modo similar para os três vetores (plasmídeo recombinante, pRT 30-2 e pRT 30-2/Dz-ftsZ), em um volume de 10 µL. As concentrações dos reagentes foram as seguintes: tampão NEB-2 1X; *HindIII* 10 U; 3 µL de vetor (~ 0,4 ug) As reações foram incubadas a 37°C, durante 2 h e, em seguida, a enzima *HindIII* foi inativada a 65°C, durante 20min.

A digestão do plasmídeo recombinante com *EcoRI* e *XhoI* ocorreram em duas etapas distintas. A primeira, envolvendo *EcoRI*, ocorreu em volume reacional de 30 µL. As concentrações dos reagentes foram as seguintes: tampão NEB *EcoRI* 1X; *EcoRI* 30 U; e 15 µL do vetor recombinante (~ 4 ug). A reação foi incubada a 37°C, durante 2 h e, em seguida, o produto de digestão foi purificado por meio do kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70). Uma alíquota de 2 µL desta amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (conforme descrito na seção 5.1.2.1), para a constatação de seu estado linear. O restante da amostra foi quantificado por análise espectrofotométrica em comprimento de onda de 260nm.

A segunda reação, envolvendo *XhoI*, ocorreu em um volume de 40 µL. As concentrações dos reagentes foram: tampão NEB-4 1X; *XhoI* 30 U; e 20 µL do plasmídeo recombinante linearizado por *EcoRI* (~ 2 µg). As reações foram incubadas a 37°C, durante 1,5 h. Todos os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1. O plasmídeo recombinante, resultante da ligação de *Ori fl* em pRT 30-2/Dz-ftsZ, foi denominado de pDESCP (sigla derivada do inglês: *DNAzyme Expression System Carried by Phage*)

5.2.3 Análise da expressão de DNazimas em pDESCP

A análise da expressão da DNazima *ftsZ* em pDESCP foi realizada para reconfirmar a funcionalidade deste sistema, após a ligação de *Ori fl*. Esta confirmação ocorreu apenas pela

análise do fenótipo morfológico de *E. coli*, causado pelo efeito intracelular da DNazima *ftsZ*. Portanto, clones de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pDESCP foram crescidos tanto em meio LB líquido quanto em LB sólido, ambos contendo ampicilina 100 μ g/mL e IPTG 1mM. Estas culturas foram incubadas a 37°C, por 16h. O crescimento em meio LB líquido ocorreu em volume de 5 ml, contido em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, sob agitação contínua de 180 rpm. Após este período, lâminas microscópicas das culturas foram preparadas, conforme descrito anteriormente (seção 5.1.1.4).

5.2.4 Curva de crescimento

Foram confeccionadas as curvas de crescimento bacteriano para cinco culturas de *E. coli* DH5 α F'Iq contendo, respectivamente: pRT 30-2 e glicose 1%; pRT 30-2 e IPTG 1mM; pDESCP e glicose 1%; pDESCP e IPTG 0,1mM; e pDESCP e IPTG 1mM. Excluindo-se a glicose e o IPTG, inerente a cada condição, todas as culturas ocorreram em 50 mL de meio LB líquido, distribuídos em frascos de vidro apropriados, com capacidade para 280mL, permitindo boa aeração. As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação de 180 rpm, com aferição da absorbância realizada a cada 2h. Os pré-inóculos utilizados neste experimento foram preparados de acordo como descrito no **ANEXO 7**.

■ ■ ■

PARTE 3

Encapsidamento de pDESCP

5.3 Produção de Partículas do Virais do fago M13 contendo pDESCP

5.3.1 Preparação do fago auxiliar VCSM13

5.3.2 Incorporação de pDESCP pelo fago auxiliar VCSM13

5.3.3 Transfecção de *E. coli* DH5 α F'IQ

5.3.3.1 Extensão da transfecção a outras linhagens de *E. coli*



5.3 Produção de Partículas Virais do Fago M13 Contendo pDESCP

5.3.1 Preparação do fago auxiliar VCSM13

O fago auxiliar utilizado neste trabalho foi o VCSM13 (Stratagene #200251). O mesmo foi amplificado na linhagem *E. coli* DH5 α F'IQ e os novos fagos produzidos tiveram seu título de entrada determinado em seguida (protocolo descrito no **ANEXO 8**).

5.3.2 Recuperação de pDESCP pelo fago auxiliar VCSM13

Uma cultura da linhagem *E. coli* DH5 α F'Iq transformada com pDESCP foi infectada com o fago auxiliar VCSM13 (produzidos anteriormente – seção 5.3.1), de modo a fazer com que este, durante sua fase de propagação⁶, pudesse recuperar (encapsidar) pDESCP (**ANEXO 9**).

5.3.3 Transfecção em *E. coli* DH5 α F'Iq

A amostra de partículas virais do fago M13 contendo pDESCP, coletada na etapa anterior (seção 5.3.2), foi utilizada para transfectar uma cultura da linhagem *E. coli* DH5 α F'Iq (sem nenhum vetor) (protocolo descrito no **ANEXO 10**). Para a seleção das células transfectadas com pDESCP, alíquotas de 10 μ L, 25 μ L e 50 μ L da cultura infectada foram plaqueadas, com auxílio de uma alça de Drigalski, em meio LB ágar contendo 200 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C, por 16h, e o título das partículas (vírions) contendo pDESCP na amostra utilizada foi calculada a partir das unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas. Estas mesmas colônias tiveram suas morfologias analisadas por microscopia óptica, após a confecção das respectivas lâminas (de acordo como descrito na

⁶ Os novos capsídeos do fago produzidos neste processo contiveram, além de seu próprio genoma, o fagomídeo pDESCP (a região 'Ori f I' deste fagomídeo é a responsável pelo seu encapsidamento). O genoma de VCSM13 contém mutações em sua origem de replicação, o que dificulta o empacotamento de seu próprio material genético.

seção 5.1.4).

Como forma de comprovar a transfecção de pDESCP, algumas colônias foram selecionadas aleatoriamente e cultivadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL. As culturas foram incubadas a 37 °C, por 16 h, em tubos de ensaios com capacidade para 10 mL, sob agitação de 180 rpm. A extração do fagomídeo foi realizada por meio do *kit* “ilustra™ plasmidPrep™ Mini Spin Kit” (GE Healthcare #28-9042-69), de acordo como sugerido pelo fabricante. Após a extração do fagomídeo, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1. Realizou-se ainda a digestão dos fagomídeos extraídos com *HindIII*, de modo a comprovar a identidade do mesmo como sendo pDESCP.

5.3.3.1 Extensão da transfecção a outras linhagens de *E. coli*

Para uma análise ampliada do sistema de entrega e expressão da DNazima *ftsZ*, utilizou-se a amostra de partículas virais do fago M13 contendo pDESCP, coletada na etapa anterior (seção 5.3.2), para transfectar diferentes linhagens de *E. coli*. Estas outras linhagens foram divididas em dois grupos: (i) *E. coli* portadoras do pilus sexual F': DH5αF'Iq e JM109; e (ii) *E. coli* não portadoras do pilus sexual F': DH5α; DH10b; BL21(DE3); K-12. A transfecção ocorreu de acordo como descrito no ANEXO 11. Para a seleção das células transfectadas, uma alíquota de 50µL de cada cultura infectada foi plaqueada, com auxílio de uma alça de Drigalski, em meio LB ágar contendo 200 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C, por 16h,

■ ■ ■

PARTE 4

Desenvolvimento de DNazima letal para *E. coli*

5.4 Projeção de DNazimas com Alvos em alanina racemase

5.4.1 Produção de substratos para as DNazimas

5.4.1.1 Isolamento e clonagem dos genes *alr* e *dadX*

5.4.1.1.1 Construção dos vetores pGalr e pGdadX

5.4.1.1.2 Análise da orientação dos insertos

5.4.1.2 Transcrição *in vitro*

5.4.2 Ensaio Cinético com as DNazimas propostas

5.4.2.1 Cinética de único *turnover*

5.4.2.2 Análise da eficiência de clivagem das DNazimas



5.4 Projeção de DNazimas com Alvos em Alanina Racemase

Com o intuito de desenvolver uma ou mais DNazimas que pudessem comprometer significativamente a viabilidade de *E. coli*, destarte, tornando-as aptas a serem usadas em pDESCP, foram propostos como alvos os genes da enzima alanina racemase *alr* e *dadX*.

Um total de 31 seqüências gênicas de alanina racemase, 17 referentes ao gene da alanina racemase biossintética (*alr*) e 14 para o da alanina racemase catabólica (*dadX*), de diferentes linhagens de *E. coli*, foram adquiridas na base de dados do *GenBank* (www.ncbi.nih.org). As diferentes seqüências de cada gene foram alinhadas no programa *ClustalW* (presente no pacote de dados do *BioEdit* versão 7.0), para a análise de similaridade entre elas.

Para que DNazimas sejam projetadas faz-se necessário conhecer a estrutura secundária de seus alvos, por meio da qual torna-se possível selecionar “trechos” candidatos a alvos. Os possíveis transcritos de RNA gerados pelos genes *alr* e *dadX* tiveram sua estrutura secundária predita por meio do programa *mFold* versão 4.6 (Zuker, 2003), conforme descrito no ANEXO 12.

As moléculas de DNazimas com motivo catalítico 10-23, propostas neste objetivo, foram desenhadas de acordo como preconizado por Santoro & Joyce (1997), observando-se recomendações descritas por Abdelgany, *et al* (2005) (protocolo descrito no ANEXO 13).

5.4.1 Produção de substratos para as DNazimas

5.4.1.1 Isolamento e clonagem dos genes *alr* e *dadX*

Para que se pudesse obter os transcritos de RNA dos genes *alr* e *dadX*, fez-se necessário, primeiramente, clonar os respectivos genes. Para esta clonagem, realizou-se a extração de DNA total da linhagem *E. coli* K12, utilizando-se o protocolo de lise alcalina, descrito no ANEXO 14. O DNA foi quantificado através de análise espectrofotométrica em 260nm, de acordo como descrito por Sambrook *et al* (1989) e armazenado em a -20 °C até seu uso.

Os genes *alr* e *dadX* foram obtidos de *E. coli* K12 por meio de amplificação gênica (PCR). Para isto, um par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado para ambos os genes de modo a copiar suas respectivas ORFs (sem o ATG). O par de oligonucleotídeos alrEC-I e alrEC-II amplificaram o gene *alr*; *dadX* foi amplificado pelo par dadXEC-I e dadXEC-II. alrEC-I e dadXEC-I contém em sua extremidade 5': (i) um nucleotídeo de adenina (A) e (ii) o sítio para a enzima de restrição *ApaI*. De outra maneira, alrEC-II e dadXEC-II contém em sua extremidade 5': (i) um nucleotídeo de adenina (A) e (ii) o sítio para a enzima de restrição *SalI*.

Para a análise empírica da melhor temperatura de anelamento dos pares de oligonucleotídeos desenhados, realizou-se duas PCRs com gradiente de temperatura. Ambas as reações ocorreram em um volume de 20µL e as concentrações dos reagentes utilizados foram: tampão GoTaq® Flexi 1X; MgCl₂ 2,0mM; dNTPmix 0,2mM; 5 pmoles de cada oligonucleotídeos (alrEC-I e alrECII ou dadXEC-I e dadXECII); GoTaq® DNA Polimerase (Promega) 1,25U; ~10ng de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: um ciclo de 95°C por 2 min; 30 ciclos de: 95°C por 40 seg, 55°C com G= ±5 por 40 seg, e 72°C por um 1min; um ciclo de 72°C por 5min; e 4°C ∞. No quadro 5 é discriminada a distribuição das temperaturas utilizadas.

Quadro 4. PCR com gradiente de temperatura. Utilizado para a análise da melhor temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeos iniciadores alrEC-II e dadXEC-II. Temperatura média inserida: 55 °C com G= ±5.

| Coluna | Temperatura °C | Coluna | Temperatura °C | Coluna | Temperatura °C |
|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|
| 1 | 49,0 | 5 | 52,8 | 9 | 58,6 |
| 2 | 49,3 | 6 | 54,3 | 10 | 59,8 |
| 3 | 50,2 | 7 | 55,7 | 11 | 60,7 |
| 4 | 51,4 | 8 | 57,2 | 12 | 61,0 |

Após a constatação da melhor temperatura de anelamento, uma nova “PCR” foi realizada para a obtenção de grande quantidade de massa dos amplicons contendo a ORF de *alr* e *dadX*. O volume reacional desta PCR ocorreu em 50 µL e as concentrações finais dos reagentes utilizados foram: tampão GoTaq® Flexi 1X; MgCl₂ 2,0mM; dNTPmix 0,2mM; 10 pmoles de cada oligonucleotídeos (alrEC-I e alrECII ou dadXEC-I e dadXECII); GoTaq®

DNA Polimerase⁷ (Promega) 1,5U; ~10ng de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 min; 30 ciclos de: 95°C por 40 seg, 58°C por 40 seg, e 72°C por um 1min; uma extensão final de 72°C por 5min; e 4°C ∞. Uma alíquota da PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1. Os amplicons contendo as ORFs de *alr* e *dadX* foram purificados por meio do kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare #28-9034-70), de acordo como preconizado pelo fabricante. Em seguida as amostras foram quantificadas por análise espectrofotométrica a 260nm (SAMBROOK *et al*, 1989).

5.4.1.1.1 Construção dos vetores pGalr e pGdadX

Os amplicons contendo as ORFs *alr* e *dadX* foram, cada um, diretamente ligados ao vetor pGEM®-T Easy, seguindo-se as instruções preconizadas pelo próprio kit (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems - Promega).

Todo o volume da reação de ligação entre o vetor e os amplicons foram, respectivamente, utilizados para transformar 50 µL de *E. coli* DH5αF'IQ quimiocompetente (ANEXO 4), de acordo como descrito no ANEXO 5. A seleção dos transformantes ocorreu em meio LB ágar, contendo ampicilina 200 µg/ml, incubado a 37°C, por 16h. Após isto, alguns transformantes foram selecionados ao acaso e então cultivados em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100µg/mL. Estas culturas foram então incubadas a 37°C, por 16h, em tubos de ensaios com capacidade para 10mL, sob agitação de 180rpm. A extração dos vetores foi realizada por meio do kit “ilustra™ plasmidPrep™ Mini Spin Kit” (GE Healthcare #28-9042-69), seguindo-se as orientações do fabricante. O material extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1.

Os vetores obtidos dos clones transformantes foram denominados previamente de pGalr e pGdadX, sendo um contendo a ORF de *alr* e ou outro a de *dadX*, respectivamente.

⁷ A enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega) deixa um nucleotídeo de adenina (A) livre na extremidade 3' após o término da síntese da fita 5'→3'.

5.4.1.1.2 Análise da orientação dos insertos

A análise da digestão enzimática de pGalr e pGdadX, com a enzima de restrição *ApaI*, permitiu selecionar os clones com as corretas orientações das ORFs *alr* e *dadX*: em sentido 5'→3', à jusante do promotor T7. As reações de digestão ocorreram em um volume de 10 µL, com as seguintes concentrações dos reagentes: tampão da reação 1X; *ApaI* (Promega) 50 U; e ~3 µL de cada vetor. As reações foram incubadas a 37°C, durante 3 h e, em seguida, *ApaI* foi inativada a 65°C, durante 20min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1.

Para a confirmação das seqüências das construções pGalr e pGdadX, realizou-se o seqüenciamento automático destas. Os oligonucleotídeos iniciadores T7 e SP6 foram utilizados para amplificar os insertos clonados. Esta etapa seguinte foi realizada no analisador automático de seqüências *MegaBACE* (Amersham Bioscience), de acordo com o protocolo descrito no **ANEXO 15**.

Alíquotas dos clones selecionados foram devidamente estocados em meio BHI líquido, contendo ampicilina 100µg/mL e glicerol (40% da solução total), e mantidos refrigerados a -80 °C. Culturas estoque em ágar nutriente, contendo ampicilina 100µg/mL, também foram preparadas.

5.4.1.2 Transcrição *in vitro*

A ORF dos genes *alr* e *dadX* contidos, respectivamente, em pGalr e de pGdadX foram amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores T7 e SP6. A PCR ocorreu em um volume de 50µL. As concentrações finais dos reagentes utilizados na reação foram: tampão GoTaq® Flexi 1X; MgCl₂ 2,0mM; dNTPmix 0,2mM; 10 pmoles de cada oligonucleotídeo (*alrEC-I* e *alrEC-II* ou *dadXEC-I* e *dadXEC-II*); GoTaq® DNA Polimerase (Promega) 1,5U; 1µL de cada amostra dos plasmídeos (pGalr ou pGdadX), diluídas 50 X. As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 min; 30 ciclos de: 95°C por 40 seg, 55°C por 40 seg e 72°C por um 1min; extensão final de 72°C por 5min; 4°C ∞. Uma alíquota de cada PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1.2.1. O restante da reação foi purificada por meio do kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE

Healthcare #28-9034-70), de acordo como preconizado pelo fabricante. As amostras contendo os amplicons purificados foram quantificadas por análise espectrofotométrica em comprimento de onda de 260nm (SAMBROOK *et al*, 1989).

O RNA da ORF dos genes *alr* e *dadX* (*alr*RNA e *dadX*RNA) foi produzido *in vitro* por meio do *kit* MEGAscript® T7 RNA Polymerase (Ambion), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. Os próprios amplicons contendo a ORF de *alr* e *dadX*, obtidos na etapa anterior, foram usados como substrato para essa reação. A T7 RNA polimerase do *kit* utilizou-se do promotor T7, presente à montante dos respectivos amplicons, para iniciar a reação de transcrição. Para proteger a integridade do RNA sintetizado durante todo o decorrer da reação de transcrição *in vitro*, utilizou-se o inibidor de RNases *RNaseOUT*®, na concentração de 20 U por reação. Após o término de cada reação, adicionou-se ainda mais 20 U de *RNaseOUT*® à amostra. A utilização de um inibidor de RNase é item recomendado pelo próprio *kit* de transcrição da *Ambion*.

O RNA sintetizado foi quantificado por análise espectrofotométrica, em comprimento de onda de 260nm, de acordo como descrito por Sambrook *et al* (1989) e, em seguida, armazenado a – 80°C até o momento do uso. O tempo máximo de armazenamento do RNA nessa condição de refrigeração não foi superior a 3 dias.

5.4.2 Ensaio Cinético com as DNAzimas Propostas

5.4.2.1 Cinética de único *turnover*

O ensaio cinético com as DNAzimas propostas seguiu como sugerido por Tan *et al* (2004), mas com algumas modificações (protocolo descrito no ANEXO 16). Tratou-se de um ensaio cinético qualitativo onde a relação entre a concentração de DNAzima:Substrato foi de 1000:1. Antes de cada ensaio cinético os substratos de RNA foram devidamente diluídos, a fim de se obter concentrações adequadas destas moléculas, explicado no referido protocolo.

5.4.2.2 Análise da eficiência de clivagem das DNazimas

Após os ensaios cinéticos, a eficiência de clivagem das DNazimas testadas foi mensurada a partir da detecção/quantificação de dois itens: (i) dos produtos formados e (ii) do substrato remanescente. Para isto, duas estratégias foram desenvolvidas:

Na **Estratégia 1** foi realizada a análise direta, por densitometria de bandas, tanto dos produtos formados quanto do substrato remanescente, baseando-se nos experimentos descritos por Tan *et al* (2004) (protocolo descrito no **ANEXO 17 – Método 1**). Neste método, todo o volume do ensaio cinético foi analisado em gel desnaturante de poliacrilamida 4% (o protocolo de confecção deste gel está descrito no **ANEXO 18**).

Na **Estratégia 2** foi realizada a análise do substrato residual por meio de duas rodadas de ampliações: a primeira envolveu uma reação de transcrição reversa, que converteu os substratos de RNA para DNA; e a segunda, uma PCR convencional. Esta estratégia seguiu de acordo como descrito por Li *et al* (2010) (protocolo descrito no **ANEXO 17 – Método 2**). Ao final do experimento, uma alíquota da PCR foi analisada em gel de agarose 1,0%, conforme descrito anteriormente.

■ ■ ■



RESULTADOS E DISCUSSÃO



6.1 Análise de pRT 30-2

A análise prévia do cassete de expressão da enzima MoMuLV-RT (APÊNDICE 1), em pRT 30-2, evidenciou um trecho de seqüência nucleotídica, à montante do códon ATG, que apresenta similaridade à seqüência do operador *lac*. De acordo com o Prof. Goff (informação pessoal), este trecho nucleotídico não condiz com um operador *lac* funcional, portanto, não sendo passível de indução por IPTG⁸. Corroborando com esta informação, os ensaios de indução com IPTG também não demonstraram nenhuma alteração da expressão da proteína recombinante, em relação a outras condições de indução estabelecidas (figura 17). A proteína MoMuLV-RT apresenta um peso molecular de 74,650 Da. A partir disto, pôde-se concluir, em definitivo, que a seqüência analisada não caracteriza um possível operador *lac*.

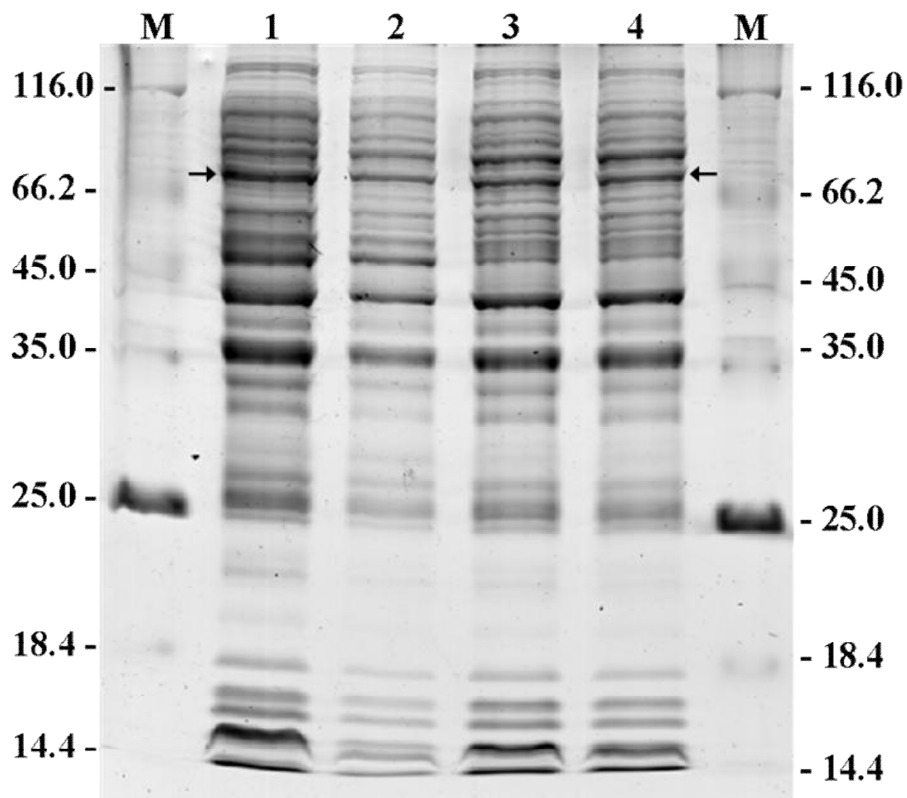


Figura 17. Análise da indução de pRT30-2. Análise do extrato protéico de *E. coli* DH5αF'Iq transformada com pRT 30-2, em diferentes condições de crescimento: 1- sem IPTG; 2- com IPTG 1mM; 3- com IPTG 1mM e Glicose 2%; 4- com Glicose 2%. M- Marcador de massa molecular. A proteína MoMuLV-RT apresenta um peso molecular de 74,650 Da (ROTH *et al*, 1985), indicada pelas setas.

⁸ IPTG é um análogo da alolactose, que serve como modulador negativo do repressor *lac*, fazendo com que este se desligue do operador e permita que a transcrição ocorra

O vetor pRT 30-2 tem aproximadamente 5,0 kb de tamanho e o cassete de expressão da MoMuLV-RT tem aproximadamente 2,4 kb. Em teoria, este último pode ser liberado do vetor realizando-se uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Infortunadamente, a ORF do gene da transcriptase reversa contém dois sítios internos de *Bam*HI (figura 18).

Após linearizar pRT 30-2, com *Hind*III, e depois de sucessivas tentativas de digestão parcial com *Bam*HI (figura 19), não foi possível se obter o cassete de expressão da MoMuLV-RT. Isto impossibilitou que este último fosse subclonado em outros vetores. O protocolo de digestão parcial desenvolvido para este propósito encontra-se descrito no ANEXO 19. Diante deste fato, optou-se pela estratégia de clonar o cassete de expressão para a DNazima *ftsZ* dentro do próprio pRT 30-2. A falta de responsividade de pRT 30-2 ao IPTG também colaborou para esta escolha.

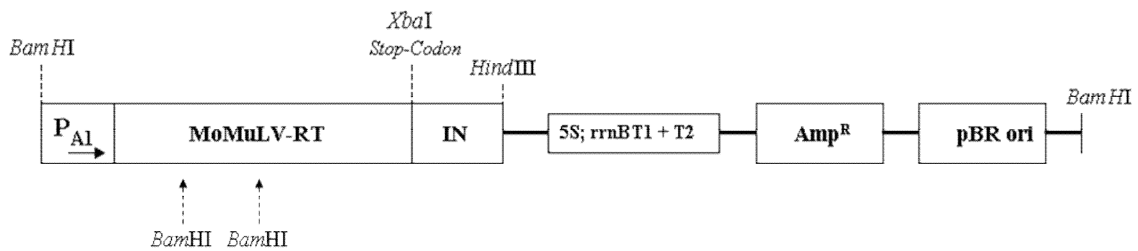


Figura 18. Esquema estrutural do vetor pRT 30-2. Vetor esquematicamente linearizado com *Bam*HI. O cassete de expressão da MoMuLV-RT é delimitado por *Bam*HI e *Hind*III e regulado pelo promotor constitutivo pA1. Existem dois sítios *Bam*HI dentro da ORF de MoMuLV-RT.

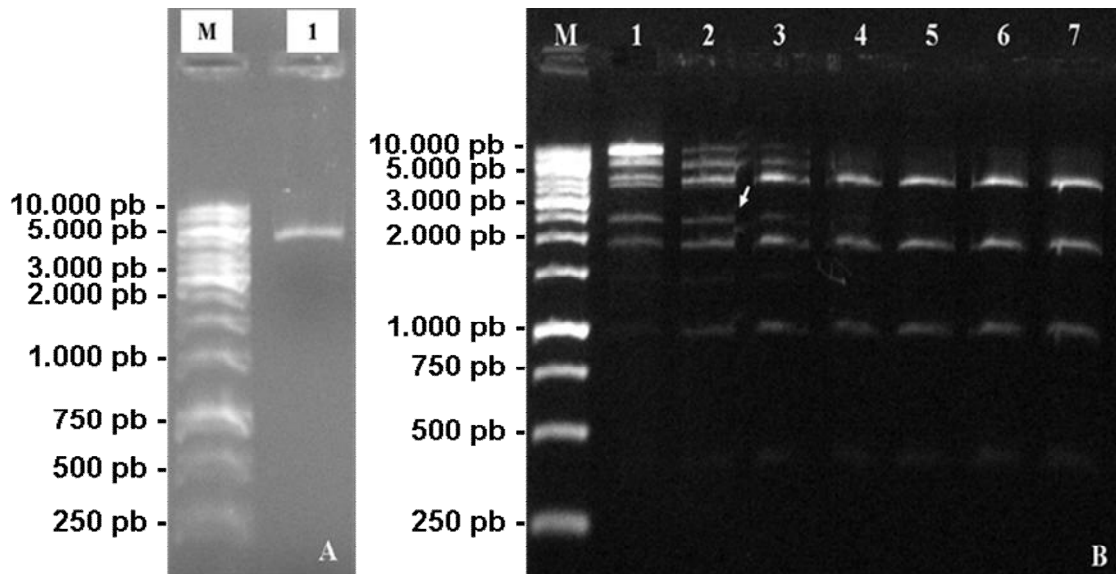


Figura 19. Digestão parcial em pRT 30-2. A- 1ª etapa: pRT30-2 linearizado (~5 kb), por meio de digestão exaustiva com *Hind*III. B- 2ª etapa: digestão parcial com *Bam*HI. As colunas de 1 a 7 contém as amostras digeridas em diferentes tempos: 1- 0 min; 2- 15 min; 3- 30 min; 4- 45 min; 5- 60 min; 6- 75 min; 7- 90 min. Observar a flecha branca indicando todo o cassete de expressão de MoMuLV-RT (~2,4 kb), na coluna 2.

6.2 Vetor de Expressão de DNazimas

A inserção do cassete de expressão da DNazima *ftsZ* em pRT 30-2 gerou o vetor recombinante pRT 30-2/Dz-*ftsZ*. A ligação desse inserto ao respectivo vetor foi confirmada por meio da digestão enzimática com *Hind*III, como pode ser observado na figura 20. O fragmento liberado após a digestão apresenta o tamanho esperado, que é de 576 pb.

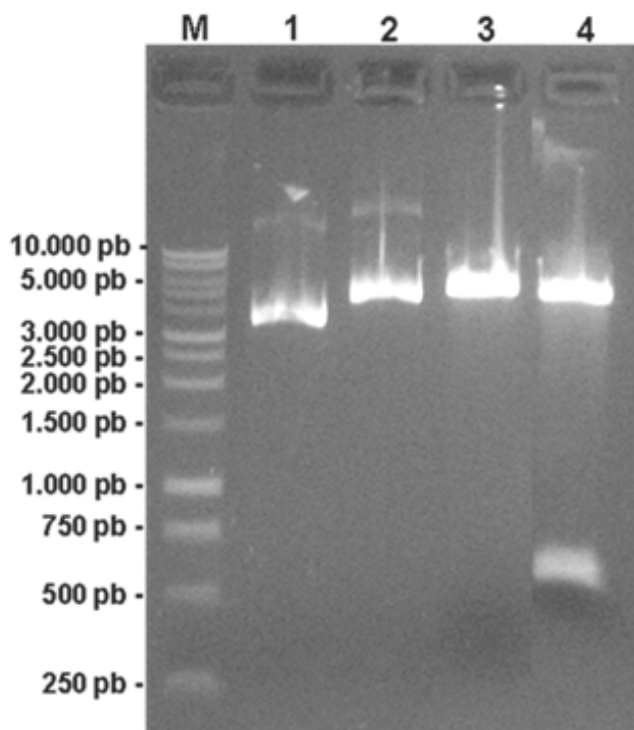


Figura 20. Confirmação da construção do vetor pRT 30-2/Dz-*ftsZ*. M: Marcador de tamanho molecular de 10 kb; 1- pRT 30-2; 2- pRT 30-2/Dz-*ftsZ*; 3- pRT 30-2 digerido com *Hind*III; 4- pRT 30-2/Dz-*ftsZ* digerido com *Hind*III. O cassete de expressão da DNazima *ftsZ* tem 576 pb e é delimitado, em ambas as extremidades, pelos sítios de restrição *Hind*III.

É importante ressaltar que pRT 30-2/Dz-*ftsZ* já apresenta o sistema de expressão da DNazima *ftsZ* proposto neste trabalho. A indução por IPTG promove a transcrição do RNA que servirá de substrato para MoMuLV-RT produzir a DNazima *ftsZ*, por meio de transcrição reversa (figura 21). É importante reafirmar que a enzima MoMuLV-RT é expressa constitutivamente, por meio de pA1, e o cassete que produzirá o RNA que originará a DNazima é regulada pelo promotor *lac* (*plac*). A transcriptase reversa apresenta uma atividade de RNase H intrínseca. Isto significa que, na medida em que transcreve a DNazima, ela degrada o substrato/molde de RNA. Destarte, para cada molécula de RNA transcrita ocorre somente a síntese de uma única molécula de DNazima.

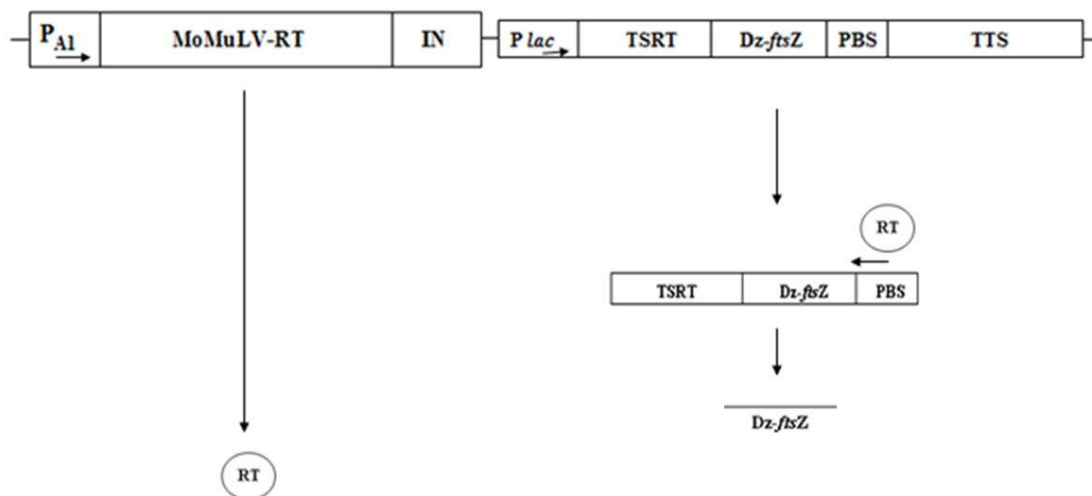


Figura 21. Esquema geral de funcionamento do sistema de expressão da DNazima *ftsZ*. A enzima MoMuLV-RT, regulada pelo promotor pA1, é expressa de forma constitutiva e responsável pela produção da DNazima *ftsZ*. Este processo se dá por meio da transcrição reversa do transcrito de RNA cuja expressão é regulada pelo promotor *plac*. A integração funcional entre esses dois cassetes formam o que se chama de “sistema de expressão de DNazimas”.

O transcrito de RNA que originará a DNazima *ftsZ* apresenta um sítio de ligação para MoMuLV-RT, conhecido pela sigla PBS^{MoMuLV-RT} (do inglês: *Primer Binding Site*). Esta enzima somente se ligará a PBS^{MoMuLV-RT} após ligar-se previamente a um tRNA endógeno da célula, que atuará como um iniciador para a transcrição reversa. Em células de mamíferos, o tRNA capturado pela MoMuLV-RT é o tRNA^{pro}, entretanto, de acordo com Panet & Berliner (1978) e Tan *et al* (2004), o tRNA^{pro} de bactérias não compartilha similaridade estrutural com aquele. Tan *et al* (2004) afirmam que em, *E. coli*, o tRNA utilizado pela MoMuLV-RT deflagrar a transcrição reversa é o tRNA^{Val}. Por esta razão, estes autores desenharam uma nova seqüência PBS^{MoMuLV-RT}, necessária para o pareamento com a extremidade 3'-OH do tRNA^{pro}: 5'_TTGGTGGTGCCTCCGAGTGGACCGGGAGACCCCTGCTCGAC_3'. Os resultados do estudo demonstraram ser esta seqüência como sendo capaz de atuar, eficientemente, como sítio de ligação para MoMuLV-RT em *E. coli* e, por esta razão foi escolhida para ser utilizada neste trabalho.

É importante destacar que desde o início do desenvolvimento de vetores de expressão para DNazimas, estes constituíam somente de um único cassete. Este último, portanto, transcrevia tanto o gene da transcriptase reversa (que era imediatamente traduzido) quanto o segmento de RNA (não traduzível) que originaria a DNazima de interesse., pelo processo já explicado anteriormente. Contudo, este padrão foi, de certa forma, alterado quando Li *et al*, em 2010, publicou a construção de um vetor de expressão para DNazimas controlado por

dois promotores. Este vetor foi desenvolvido para funcionar em células humanas em cultura e foi denominado de pSDE01–DZt1.

Em pSDE01–DZt1, um dos cassetes é responsável pela expressão de MoMuLV-RT, e é regulado pelo promotor $P_{EF-1\alpha}$ (promotor do fator de alongação 1α). O outro cassete é responsável pela liberação do transcrito de RNA que originará a DNAzima, sendo este, regulado por pCMV (promotor do Citomegalovírus).

Li *et al* (2010) afirmaram que pSDE01–DZt1 é mais moderno do que os demais vetores para expressão de DNAzimas até então existentes. De acordo com estes autores, ele rege a produção de dois transcritos que necessitam ser produzidos em quantidades diferentes. Ou seja, produz uma maior quantidade do transcrito de RNA que originará a DNAzima e menor quantidade da transcriptase reversa, que, *per si*, apresenta uma processividade relativamente alta. Este “refino” na produção de DNAzimas não desloca, ou compromete, a maquinaria bioquímica da célula para produzir transcritos em demasia, como se especula que aconteça para os vetores pxxXD e pssXE (LI *et al*, 2010). Nestes últimos, o aumento da taxa de transcrição do cassete, necessário para uma maior produção intracelular de DNAzima, também acarretaria no aumento da expressão da transcriptase reversa, haja vista eles fazerem parte de um único transcrito. Li *et al* (2011) especularam que o excesso da enzima transcriptase reversa poderia ser tóxico para a célula.

6.3 Análise da Funcionalidade do Sistema de Expressão de DNAzima

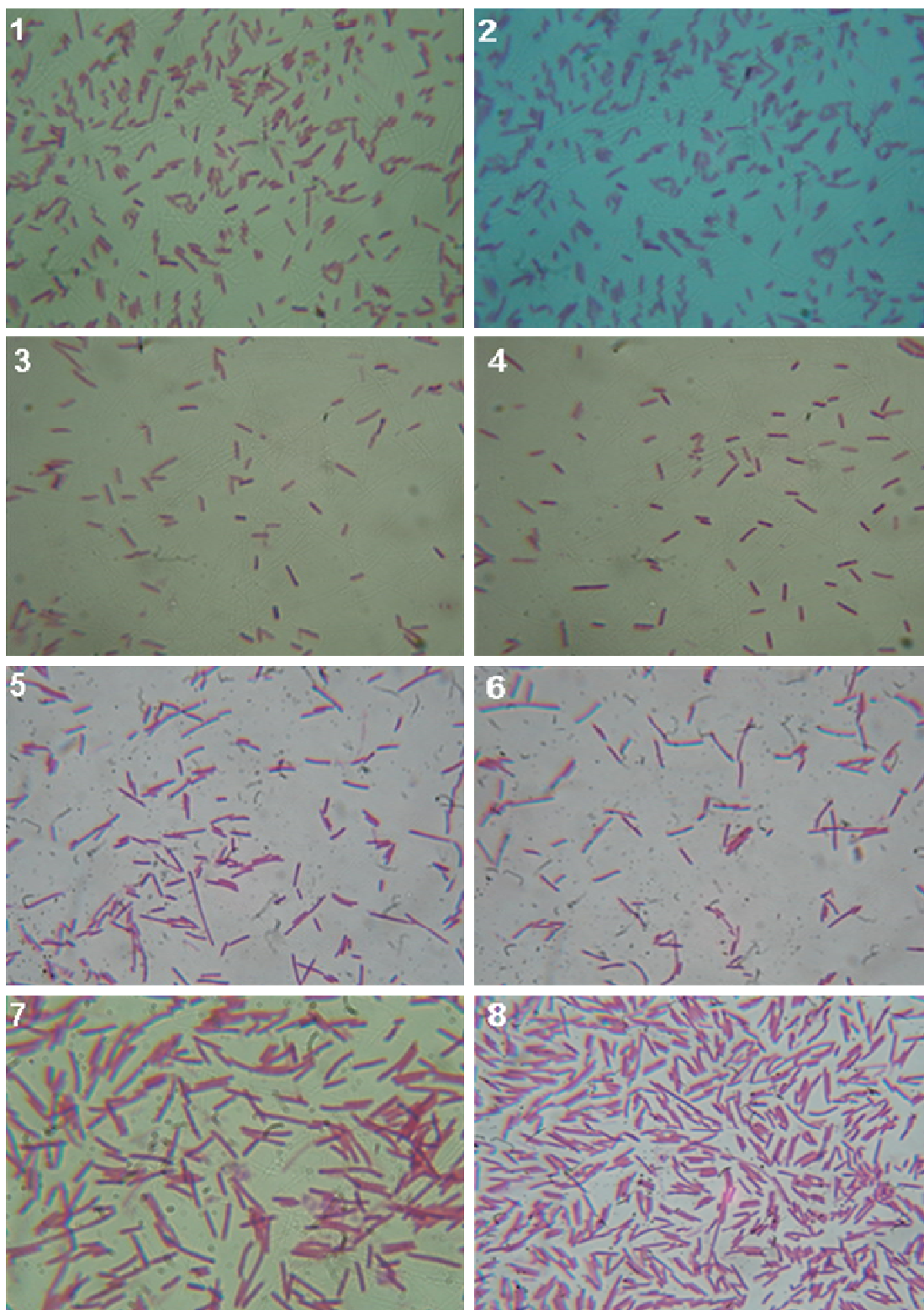
A indução de pRT 30-2/Dz-ftsZ (por IPTG 1mM) em *E. coli* DH5 α F'Iq demonstrou uma mudança da morfologia bacilar padrão desta bactéria, que passou para a forma filamentosa, com destaque para a presença de inúmeros nucleóides (poliploidia) (quadros 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 da figura 22). As culturas crescidas em meio sólido apresentaram uma morfologia significativamente mais filamentosa (quase a totalidade das estruturas celulares da cultura) do que as culturas crescidas em meio líquido. Em culturas crescidas sem IPTG e na presença de glicose 2% foi constatado algum nível de filamentação das bactérias. Estas eram mais alongadas do que as da cultura controle, além de, também, apresentarem mais de um nucleóide (quadros 5, 6, 7 e 8, da figura 22).

Pelo fato de o agente indutor (IPTG) do sistema de expressão de DNazimas, em pRT 30-2/Dz-*ftsZ*, ter ocasionado a alteração morfológica em *E. coli* DH5 α F'Iq, conclui-se que a DNazima *ftsZ* esteja sendo produzida!

Os resultados observados para as culturas crescidas em meio sem IPTG e, ainda, contendo glicose 2%, sugerem que, de algum modo, uma expressão residual esteja ocorrendo. A glicose atua se ligando à proteína “CAP”, com isto, dificultando para uma correta estabilização da RNA polimerase ao promotor *lac*. De acordo com Oehler *et al* (1990) e Oehler *et al* (1994), mais de 80% das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* são induzidas por IPTG. Todos os vetores comerciais induzíveis por IPTG apresentam expressão residual de seus respectivos genes. Estes vetores de expressão contêm geralmente somente um operador *lac*, a jusante de um promotor indutível. De acordo ainda com estes autores, são necessários dois ou três operadores para maximizar a repressão, pois, no operon *lac* natural, três operadores *lac* controlam este promotor.

Apesar de o repressor *lacIq* ser fortemente expresso em algumas linhagens bacterianas geneticamente modificadas para albergarem vetores que contenham o operador *lac*, este ainda necessitaria ser superexpressos. A necessidade dessa superexpressão se faz necessária pelo fato de *lacIq* não apresentar grande afinidade pelo respectivo operador, sendo, portanto, a causa de freqüentes “vazamentos transcricionais” (OEHLER *et al*, 1990; OEHLER *et al*, 1994). A estrutura do cassete de expressão de DNazima, desenvolvido neste trabalho, possibilita que, por meio dos sítios *ApaI* e *XbaI* (figura 16), um ou dois outros operadores *lac* ainda possam ser inseridos em sua estrutura. Isto poderia promover a diminuição da ocorrência de expressões residuais.

Quando *E. coli* DH5 α F'Iq, transformadas com pRT 30-2/Dz-*ftsZ*, foram cultivadas em meios de cultura sólido contendo, respectivamente, 0,1mM e 0,5mM de IPTG, observou-se uma redução significativa do fenótipo filamentosos (dados qualitativos). De outro modo, observou-se máxima filimentação das células que cresceram na presença de 2 mM de IPTG. É interessante mencionar que esta avaliação ocorreu sob o ponto de vista qualitativo, ou seja, a partir da observação de lâminas microscópicas, preparadas a partir das culturas. Não houve alteração observável da morfologia e da quantidade de células filimentadas nas concentrações de 4mM e 6mM de IPTG (dados não mostrados). Estes resultados também indicam que o IPTG não está sendo tóxico para a célula e reforçam ainda que a alteração da morfologia bacilar para a filimentosa ocorre unicamente em decorrência da produção da DNazimas *ftsZ*.



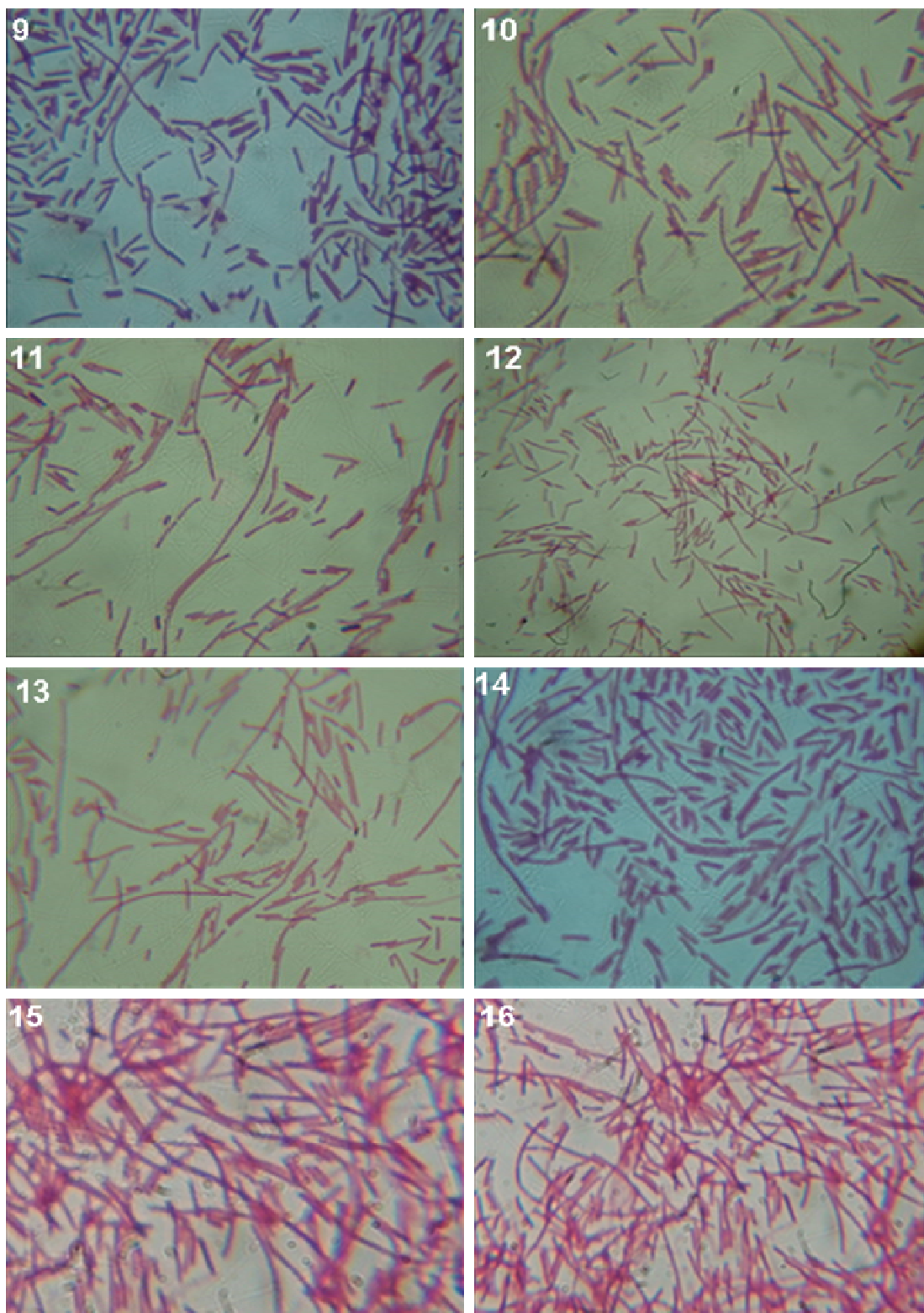


Figura 22. Análise de pRT 30-2/Dz-ftsZ em *E. coli*. Análise microscópica da morfologia de *E. coli* DH5aF'Iq em diferentes condições de crescimento, em meio LB ágar contendo ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$. 1- sem vetor, meio com glicose 2%; 2- sem vetor, meio com IPTG 1 mM; 3- com pRT 30-2, meio com glicose 2%; 4- com pRT 30-2, meio com IPTG 1mM; 5, 6, 7 e 8 - com pRT 30-2/Dz-ftsZ, meio com glicose 2%; 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 - com pRT 30-2/Dz-ftsZ, meio com IPTG 1mM.

A projeção, *in silico*, da estrutura secundária do transcrito do gene *ftsZ* de *E. coli* é mostrada na figura 23. Nesta, é possível observar o “região alvo” de ação da DNazima *ftsZ*. Um dos grandes problemas atrelados à projeção de DNazimas está na correta elucidação da estrutura secundária dos RNA sobre o qual atuam.

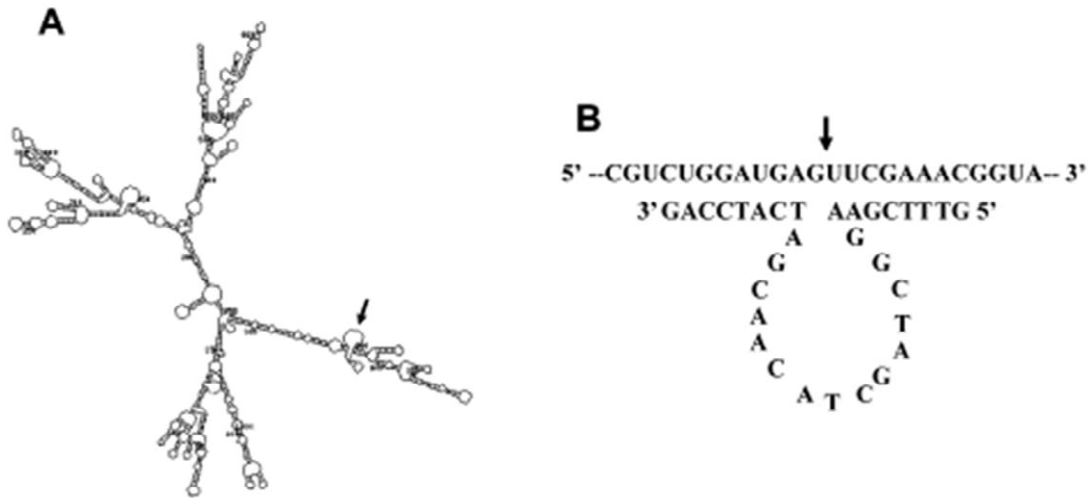


Figura 23. Demonstração, *in silico*, do alvo da DNazima *ftsZ*. A- Projeção da estrutura secundária do transcrito do gene *ftsZ*, demonstrando o local de atuação da DNazima *ftsZ*. B- DNazima *ftsZ* e seu alvo.

Fonte: Tan *et al* (2004).

A proteína FtsZ é o homólogo procariótico da tubulina em eucariotos. Em *E. coli*, FtsZ é o componente primário do aparato de divisão celular; esta proteína forma uma estrutura em anel (conhecido como anel Z), que é o local de divisão celular. O “anel Z”, em conjunção com outras proteínas de divisão celular, atua como um anel contrátil que efetua a divisão da célula (STRICKER & ERICKSON, 2003; TAN *et al*, 2004; GALLI & GERDES, 2012).

Tan *et al* (2004) demonstraram *in vitro* que a DNazima *ftsZ* foi capaz de clivar o transcrito do gene *ftsZ* no local proposto (figura 23). Contudo, *in vivo*, esta não foi capaz de comprometer de forma significativa a viabilidade celular de *E. coli* DH5 α transformada com o vetor pssXG. O vetor pssXG foi desenvolvido por Tan *et al* (2004) para a expressão desta DNazima.

De acordo com Tan *et al* (2004), a expressão intracelular da DNazima *ftsZ*, em *E. coli* DH5 α , foi capaz de alterar significativamente a morfologia desta bactéria, que passou de bacilar para a forma filamentosa, com presença de inúmeros nucleóides. Estes dados corroboram com a massa celular mensurada durante a progressão do tempo de crescimento.

Os autores explicam isto como uma inibição da proliferação celular normal. Ou seja, as bactérias não se dividiram originando células filhas viáveis, mas cresceram em massa, como evidenciado pela poliploidia acentuada da cultura. Stricker & Erickson (2003) e Tan *et al* (2004) relatam que estas células poliplóides podem crescer, entretanto, são mais sensíveis à lise do que células normais.

Em um elegante experimento realizado por Stricker & Erickson (2003) foi analisado o efeito de inúmeras mutações no gene *ftsZ* de *E. coli*. Neste experimento, uma cepa de *E. coli* (JKD7-1) contendo o gene *ftsZ* deletado era mantida viável através da sua complementação com um plasmídeo de salvamento (pKD3), que continha um alelo normal para o gene *ftsZ*. O vetor pKD3 somente expressava o gene *ftsZ* quando a bactéria crescia a 30°C. Para se testar os efeitos dos inúmeros outros plasmídeos contendo alelos de *ftsZ* mutados, a cepa JKD7-1/pKD3 foi transformada com cada um destes vetores, entretanto, a bactéria crescia agora em 42°C. Esta temperatura permitia estes plasmídeos expressarem seus respectivos alelos, ao mesmo tempo em que reprimia pKD3. Ao usarem um vetor sem nenhum alelo do gene *ftsZ*, e outro contendo um alelo não complementar a *ftsZ*, foi observado que as células se dividiam por aproximadamente 180 min, seguido de uma filamentação entre 200 e 240 min. A partir de 240 minutos a cultura permaneceu com uma D.O.₆₀₀=0.4 e as células eram 6 a 12 vezes mais longas do que as células normais (que continham o alelo *ftsZ*). A extensão da incubação para além deste ponto resultava em um ligeiro aumento da filamentação, acompanhado de uma diminuição da D.O. da cultura que, segundo os autores, era devido à lise das células. Stricker & Erickson (2003) não cogitaram sobre o fato de a célula permanecer relativamente viável nesta condição.

Um achado interessante descrito por Charbon *et al* (2009) relata a importância da crescentina na manutenção/estabilização da forma celular alongada da bactéria *Caulobacter crescentus*. A crescentina é uma proteína com função similar aos filamentos intermediários, nas células eucarióticas, ou seja, forma uma malha bidimensional sob a membrana plasmática interna dessas bactérias, capaz de dar suporte à forma e ao estresse mecânico destas (CHARBON *et al*, 2009; CABEEN *et al*, 2009). Segundo Charbon *et al* (2009) a crescentina se estende com o comprimento da célula. Em um interessante experimento estes autores cresceram uma linhagem de *E. coli* (CJW2209) sobre uma superfície sólida em uma condição na qual o gene *ftsZ* não estava sendo expresso, enquanto o gene da crescentina sim. Foi constatado que a medida que a célula cresce, tornando-se filamentosa, a malha de crescentina vai aumentando lentamente, o que sugere que esta atua como um suporte mecânico às novas dimensões da célula. A alongação da estrutura da crescentina é bidirecional, ocorrendo de

ambas as extremidades para o centro. Quando este processo de filamentação ocorreu em meio de cultura líquido, percebeu-se que esta malha protéica é responsável por ocasional encurvamento na forma das bactérias, se concentrando bastante nos pontos de curvatura.

Cabeen *et al* (2009) relata que quando crescentina é sintetizada ectopicamente em *E. coli*, uma γ -Proteobacterium, esta pode formar estruturas filamentosas funcionais ao longo da membrana celular, sendo a responsável pela manutenção da curvatura durante a elongação desta bactéria. Apesar da grande divergência evolutiva entre *E. coli* e *C. crescentus*, isto indica que a ligação entre a crescentina e a parede celular é mediada por componentes genéricos, tais como MreB. MreB é uma proteína encontrada em algumas bactérias e é considerada como sendo um homólogo da actina. Um fato intrigante é que a crescentina não se liga em bactérias que não apresentam MreB, por mais que estas bactérias sejam mais próximas do ponto de vista evolutivo do que *E. coli*. A crescentina, ou sua forma equivalente, ainda não foi encontrada ocorrendo naturalmente em *E. coli*. Aliás, sobre o citoesqueleto de *E. coli*, muito ainda se há para esclarecer.

O fenótipo filamentoso observado em *E. coli*, após indução de pRT 30-2/Dz-ftsZ, sugere alguma “perturbação” no aparato de divisão celular dessa bactéria. Faz-se mister reafirmar que a proteína FtsZ é o principal agente organizador do centro de divisão celular em *E. coli*. A falta desta proteína em nível intracelular, ou mesmo a sua redução, resulta em uma desorganização do “anel contrátil”, responsável pela divisão bacteriana. Por conta dos resultados obtidos, sugere-se que o sistema de expressão para DNazimas, desenvolvido neste trabalho, está funcionando e, portanto, expressando a DNazima *ftsZ*. Contudo, apesar disto, é fato mencionar que muito ainda há para ser entendido sobre a real função da proteína FtsZ em *E. coli*, suas interações e dinâmica durante e antes a divisão bacteriana (FEUCHT & ERRINGTON, 2005; LAN *et al*, 2009; GALLI & GERDES, 2012).

No que se refere à expressão propriamente dita da DNazima *ftsZ*, foi possível comprovar a existência de ssDNA junto ao extrato de RNA total obtido de *E. coli* DH5 α F'Iq, transformadas com pRT 30-2/Dz-*ftsZ*. Após degradação exaustiva deste RNA, por meio da RNase H, moléculas de DNA fita simples foram detectadas após eletroforese em gel de agarose 3% (figura 24).

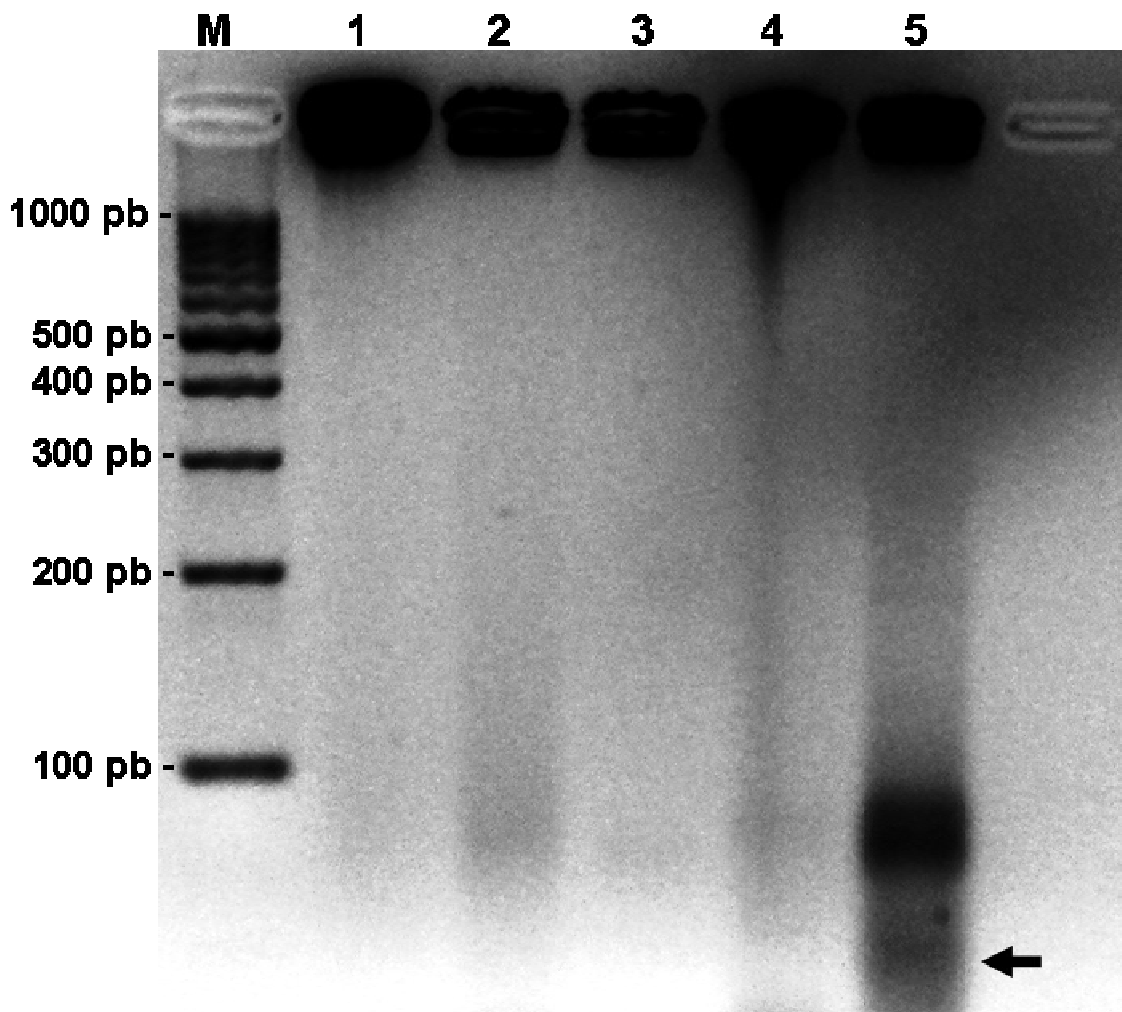


Figura 24. Expressão da DNazima *ftsZ* em *E. coli* DH5αF'Iq. M- Marcador de tamanho molecular 1 kb; 1- sem vetor; 2- com pRT 30-2, meio contendo glicose 2%; 3- com pRT 30-2, meio contendo IPTG 1 mM; 4- com pRT 30-2/Dz-*ftsZ*, meio contendo glicose 2%; 5- com pRT 30-2/Dz-*ftsZ*, meio contendo IPTG 1 mM. Na coluna 5 é possível observar a presença de moléculas de DNA fita simples, com diferentes tamanhos: ~ 30 nt, ~ 60 nt e ~ 80 nt de comprimento. Todas estas moléculas contém a seqüência da DNazima *ftsZ*. A flecha indica um segmento provavelmente correspondente à seqüência da DNazima *ftsZ* (31 nt) isolada, ou seja, não flanqueada por segmentos nucleotídicos à montante ou à jusante, resultantes da extensão da transcrição.

A constatação de moléculas de ssDNA unicamente nas bactérias que foram crescidas em meio com IPTG sugere que o sistema de expressão para a DNazima *ftsZ* está funcionando. Se considerarmos que o volume de amostra aplicado no gel de agarose foi de 10 μ L, podemos perceber que bastante DNazima foi produzida pela indução de 1 mM de IPTG. Este fato, aliado ainda à filamentação de *E. coli*, dá forte indício de que a DNazima descrita por Tan *et al* (2004) está sendo produzida pelo sistema desenvolvido neste trabalho e, ainda, que esta provoca algum efeito inibidor sobre a divisão da bactéria.

Observando mais atentamente o gel de agarose da figura 24, temos que: (i) a DNAzima *ftsZ* tem um tamanho de 31 nt e existe uma região, no gel, que apresentam moléculas de ssDNA com esta faixa de tamanho (identificada no gel pela seta negra - coluna 5); (ii) existem outras frações significativas de ssDNA que também estão sendo produzidas e que podem ser observadas no gel imediatamente acima da banda destacada pela seta negra. Diante dessas constatações, sugere-se duas hipóteses: (i) parte do terminalizador de transcrição reversa está, também, sendo transcrito; e (ii) parte do terminalizador de transcrição reversa mais parte da região de ligação da enzima MoMuLV-RT estão, também, sendo transcritos. Uma quantidade significativa de ssDNA produzido tem um tamanho compreendido de 60 e 80 nt. É importante destacar que todas as moléculas de ssDNA que foram expressas por este sistema contém a seqüência da DNAzima *ftsZ*. Outro fato a ser destacado é que dificilmente algum sistema de expressão de “DNAzima 10-23” irá conseguir transcrever somente os 31 nt condizente à molécula. Destarte, é, portanto, comum a presença de segmentos a montante (em menor proporção) e a jusante de qualquer segmento de DNAzima, produzida por qualquer sistema de expressão (RASMUSSEN *et al*, 2007).

Chen *et al* (2004) conseguiram confirmar que a inserção de um segmento de DNAzima com motivo catalítico “10-23” dentro do DNA circular do fago M13mp18 conseguiu diminuir a tradução de um transcrito do gene da β -lactamase (seu alvo). Esses autores sugeriram que, mesmo dentro do um DNA circular, esta DNAzima foi capaz de assumir sua estrutura secundária característica, necessária para clivar seu alvo. Obviamente, a estrutura secundária formada pela DNAzima só é possível durante a fase replicativa do genoma do fago, quando seu DNA assume a forma de ssDNA. Baseado no preposto é conveniente sugerir que, apesar do fato de que uma quantidade significativa da DNAzima *ftsZ* esteja sendo produzida flanqueada por segmentos nucleotídicos a montante ou a jusante, isto não comprometeria totalmente seu funcionamento. Abdelgany *et al* (2005) relatam que braços assimétrico poderiam, mesmo, promover uma maior estabilidade nas DNAzimas “10-23”, principalmente se o braço II for maior do que o braço I, pois o braço II é o responsável pela estabilidade da DNAzima com seu alvo de RNA. Contudo, é digno de nota que Abdelgany *et al* (2005) se referem a braços assimétricos que estejam completamente pareados a seus alvos. Desse modo, deve-se sempre ser cauteloso com os resultados; cada caso deve ser analisado em suas minúcias, pois, o contrário também pode ocorrer, com a perda ou diminuição da afinidade da DNAzima pelo seu substrato.

O terminalizador de transcrição reversa, utilizado neste trabalho, foi o mesmo usado por Li *et al* (2010). Estes autores conseguiram reduzir a expressão de seu RNA alvo em

78,26%. O uso deste não impede que outros terminalizadores possam vir a ser inseridos (testados) no cassete de expressão da DNazima *ftsZ*. A presença dos sítios de restrição *ApaI*, *XbaI*, *AvrII* e *Sall*, inseridos neste cassete, podem ser utilizados para esta finalidade, assim como também para a inserção de outras DNazimas.

6.4 Fagomídeo pDESCP e sua Veiculação para *E. coli*

6.4.1 Construção de pDESCP

A amplificação da região *Ori fl* foi devidamente confirmada por meio da geração de um amplicon com aproximadamente 472 pb de comprimento, obtido a partir de pGEM®-T Easy, por Orif1-F /Orif1-R. Este amplicon foi observado após eletroforese em gel de agarose 0,8% (figura 25) e apresenta o tamanho esperado.

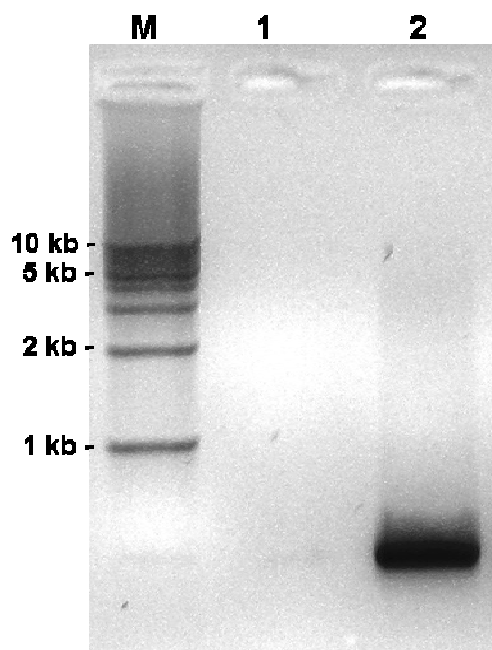


Figura 25. Amplificação de *Ori fl*. M- Marcador de tamanho molecular 10 k; 1- Controle negativo (sem vetor); 2- Amplicon contendo *Ori fl*. Nota: a região *Ori fl* foi amplificada a partir do vetor pGEM®-T Easy.

A ligação de *Ori fl* entre os sítios *EcoRI* e *XhoI*, localizados dentro do cassete de expressão da DNazima *ftsZ*, contido em pRT 30-2/Dz-*ftsZ*, transformou este último em pDESCP (sigla derivada do inglês: **DNAzyme Expression System Carried by Phage**)

A análise de pDESCP, por meio de digestões enzimáticas, confirmou tanto a ligação do cassete da DNazima *ftsZ* quanto a ligação de *Orifl*, neste. A digestão com *HindIII* liberou um fragmento de aproximadamente 1.040 pb de comprimento (coluna 4, da figura 26), resultado dos 576 pb do cassete de expressão da DNazima *ftsZ* fusionado ao inserto que contém a região *Ori fl*, e que apresenta 472 pb de comprimento. A região *Ori fl* propriamente dita tem 455 pb de comprimento. É importante ressaltar que os oligonucleotídeos desenhados para amplificar *Ori fl* geram algum trecho de seqüência nucleotídica à montante e à jusante desta região, condizentes aos sítios *EcoRI* e *XhoI*, presentes em suas extremidades 5' (quadro 1). A dupla digestão de pDESCP com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* confirmou a liberação do inserto contendo *Ori fl* (coluna 5, da figura 26). Este último fragmento corrobora ainda com o amplicon contendo *Ori fl* obtido de pGEM®-T Easy, por meio de *Orifl*-F /*Orifl*-R (coluna 6, da figura 26).

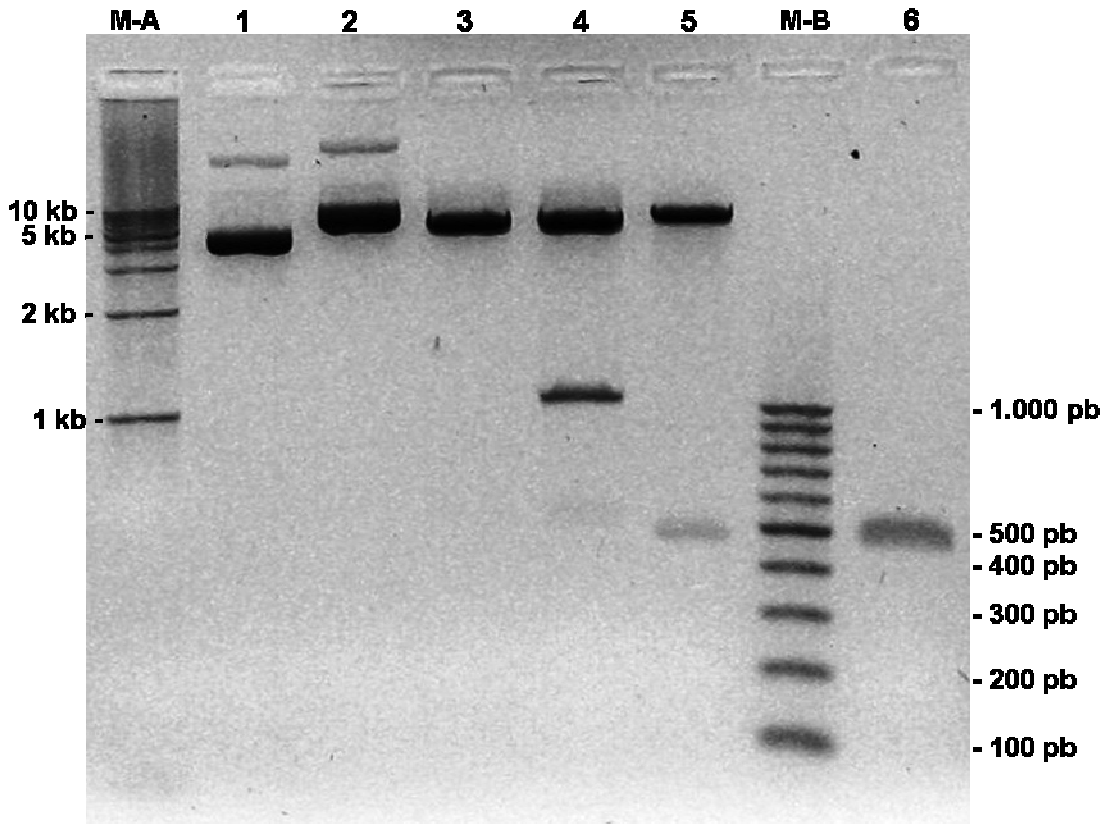


Figura 26. Análise da construção de pDESCP. M-A: Marcador de tamanho molecular de 10 kb; 1- pRT 30-2; 2- pDESCP; 3- pRT 30-2 digerido com *Hind*III; 4- pDESCP digerido com *Hind*III; 5- pDESCP duplamente digerido com *Eco*RI e *Xho*I; M-B: Marcador de tamanho molecular de 1 kb; 6- Amplicon de *Ori fl* obtido a partir de pGEM®-T Easy, por *Orif*1-F/*Orif*1-R.

Para a análise da orientação dos insertos em pDESCP foram realizadas cinco reações de digestão enzimática: (i) digestão com *Hind*III; (ii) dupla digestão com *Eco*RI e *Xho*I; (iii) digestão com *Eco*RI; (iv) dupla digestão com *Xba*I e *Eco*RI; e (v) dupla digestão com *Xba*I e *Xho*I. A análise dos produtos de digestão obtidos possibilitou esclarecer a correta orientação dos insertos. O esquema da construção de pDESCP pode ser visualizado nas figuras 27 e 28.

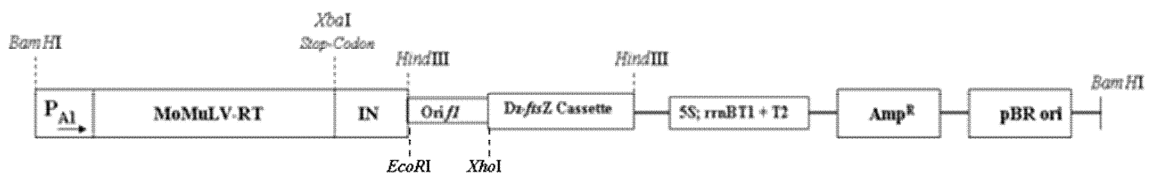


Figura 27. Estrutura básica da construção de pDESCP, linearizado. pDESCP está linearizado com *Bam*HI. a região *Ori fl* está inserida entre os sítios *Eco*RI e *Xho*I, existentes dentro do cassete de expressão da DNAzima *ftsZ*. Os dois cassetes estão fisicamente separados pela região *Ori fl*.

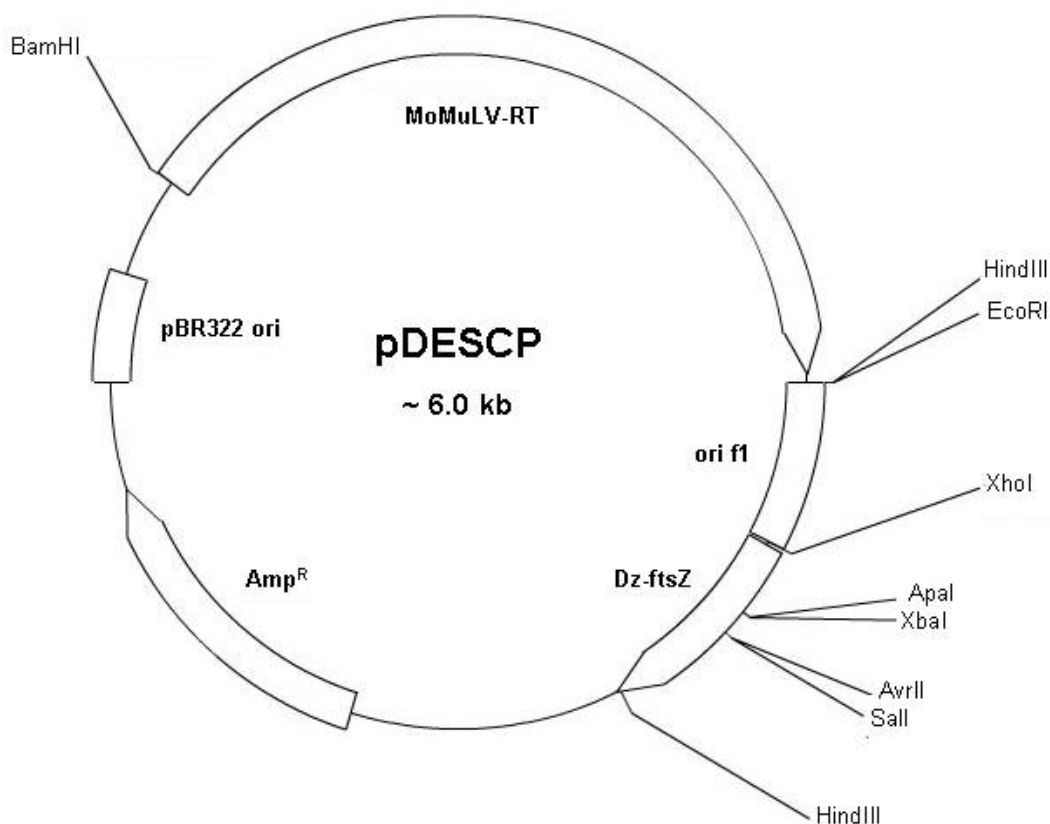


Figura 28. Estrutura básica da construção de pDESCP, na forma de vetor fechado. pDESCP tem aproximadamente 6 Kb.

6.4.2 Curva de crescimento

A curva de crescimento confeccionada para culturas de *E. coli* DH5 α F'Iq (figura 29) demonstrou que as bactérias transformadas com pDESCP, e induzidas com 0,1 mM e 1 mM de IPTG (culturas 4 e 5, respectivamente), apresentaram uma D.O. superior ao observado para a cultura 3 (transformadas com pDESCP, em meio com glicose 1% e sem IPTG). Sugere-se que a causa disto seja devido a um expressivo processo de filamentação, ocorrido nas culturas 4 e 5, onde a turbidez reflete o aumento da massa celular. O processo de filamentação de *E. coli*, contudo, não foi capaz de comprometer a viabilidade destas bactérias; se tal fato ocorreu, não se deu de modo expressivo. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por Tan *et al* (2004). Estes últimos demonstraram que a DNazima *ftsZ* não foi capaz de comprometer, *in vivo*, a viabilidade celular de *E. coli* DH5 α . Apesar disto, estes autores demonstraram que,

in vitro, esta DNAzima tem notória capacidade para clivar o transcrito do gene *ftsZ*. Apesar deste experimento ter sido realizado (repetido) 3 vezes, faz-se mister deixar claro que as próprias culturas bacterianas podem ter (ou causar), ainda, alguma interferência na D.O. mensurada, haja vista serem estas ricas em elementos particulados.

Pelo fato de estarmos usando a DNAzima *ftsZ*, para validar nosso sistema, é coerente afirmar que o anel contrátil, formado pela proteína FtsZ, não esteja se organizando de maneira adequada em bactérias que expressam esta DNAzima a partir de pDESCP. Este fato, contudo, não influenciou na viabilidade de *E. coli*, mas a deixou com um fenótipo filamentosos. A partir destes resultados, especula-se que *E. coli* está criando algum mecanismo para suportar a tensão imposta pelo aumento de sua superfície celular, em detrimento de uma redução na frequência de divisão celular, causado pela diminuição da proteína FtsZ. Talvez este aumento da superfície celular seja o responsável por reter boa parte da luz polarizada que incide na amostra, causando um aumento da absorbância. Estes dados devem, contudo, ser mais bem compreendidos. Outro ponto a se comentar é que se há algum tipo de comprometimento da viabilidade celular, causada pelo aumento da tensão superficial nas células filamentadas, isto seja um evento não significativo. Pelas hipóteses abordadas, não se descarta a possibilidade de que a manutenção da viabilidade celular de *E. coli* no estado filamentosos seja, de algum modo, suprido por algum tipo de malha protéica bidimensional semelhante à crescentina (CHARBON *et al*, 2009; CABEEN *et al*, 2009, LI *et al*, 2013; CHANG & HUANG, 2014).

Ainda por meio da análise do gráfico da figura 29, observa-se que as culturas 1 e 2 (*E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2 - utilizadas como controle negativo) apresentaram um crescimento reduzido em relação às culturas 4 e 5. Isto contribui ainda mais com as hipóteses apresentadas anteriormente e enfatiza o processo de filamentação, como resultado da atuação da DNAzima *ftsZ*.

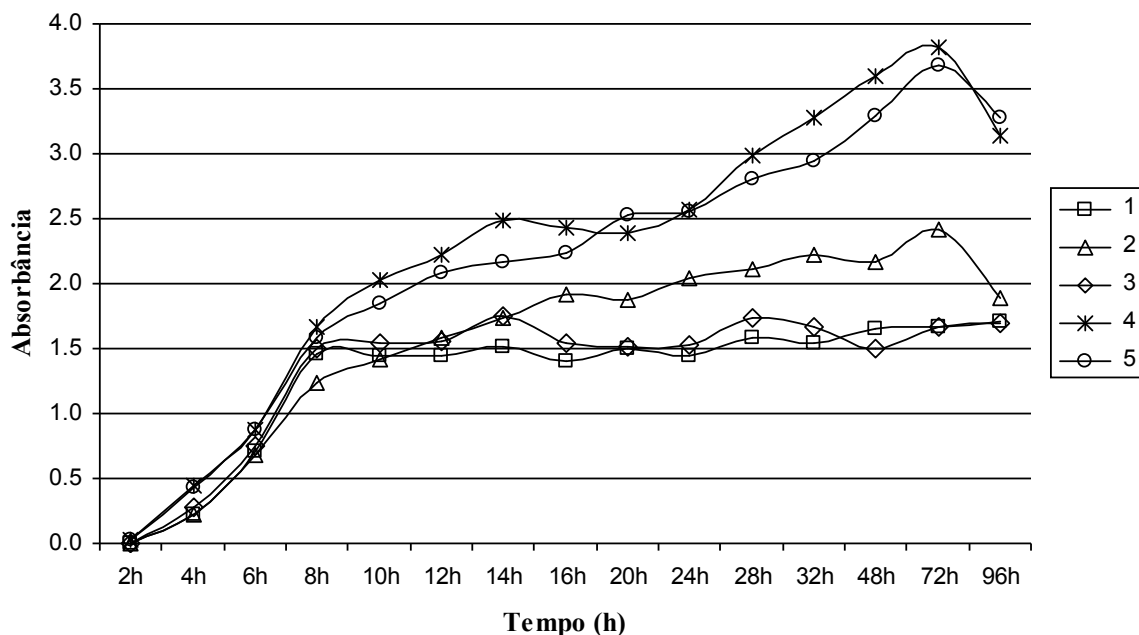


Figura 29. Curva de crescimento. Culturas de *E. coli* DH5aF'Iq transformadas e crescidas com: 1- pRT 30-2 e glicose 1%; 2- pRT30-2 e IPTG 1mM; 3- pDESCP e glicose 1%; 4- pDESCP e IPTG 0,1 mM; 5- pDESCP e IPTG 1mM.

Pela análise da curva de crescimento podemos verificar que as culturas 1, 2 e 3 cresceram juntas, em ritmo exponencial, até o tempo de aproximadamente 8h. Após este período, observa-se uma longa fase estacionária para todas as culturas. É válido mencionar que nas culturas 1 e 2 (controles negativos) não existe a possibilidade de produção da DNAzima *ftsZ*, enquanto que na cultura 3 o cassete existe, mas não está induzido. Entretanto, por se tratar de *plac*, não se exclui a possibilidade de expressão residual.

As culturas 4 e 5 cresceram juntas, em ritmo exponencial, até o tempo de aproximadamente 72 h. Após este período, notou-se um decréscimo da D.O., iniciando o início da fase de morte. Estas culturas cresceram em meio contendo IPTG e, portanto, estavam produzindo a DNAzima *ftsZ*.

No que se refere a longa fase estacionária, obtida em todas as culturas, é válido relatar os experimentos realizados por Lima (2008). Esta autora realizou um experimento envolvendo a construção da curva de crescimento para a linhagem *E. coli* DH5a, transformada com vetor pVAX1/LacZ-BGH, onde obteve resultado semelhante. Com a delonga da fase estacionária, a autora interrompeu a leitura da D.O. no tempo de 30 h. De acordo com a mesma, isto é causado pela expressão do fator σS (sigma S), um regulador responsável pela

indução de muitos genes de resposta a condições de stress que surgem na fase estacionária, associadas principalmente a condições de escassez de nutrientes e de oxigênio.

Após a confecção da curva de crescimento, realizou-se uma nova cultura de *E. coli* DH5 α F'Iq, transformada com pDESCP. Esta cultura foi incubada nas mesmas condições estabelecidas para a obtenção da curva de crescimento. A cada intervalo de 2h, até o tempo de 12h, foram retiradas alíquotas para a confecção de lâminas microscópicas, para observação da filimentação das bactérias. Desde a primeira lâmina analisada, observaram-se estruturas filamentosas de *E. coli*. Estas estruturas também foram observadas na 6ª e última lâmina, contudo, com uma densidade celular maior em relação à primeira. Neste experimento não se pode detectar o tempo preciso em que se inicia a formação das estruturas filamentosas.

6.4.3 Encapsidamento pDESCP e Análise da transfecção

A partir da amplificação do fago auxiliar VCSM13, em *E. coli* DH5 α F'Iq, foi obtida uma solução de fagos estoque com título de aproximadamente 1×10^{11} UFP/mL. Estes vírions foram utilizados na recuperação (encapsidamento) de pDESCP, obtendo-se um extrato de partículas virais contendo tanto este fagomídeo quanto o próprio genoma de M13. O extrato obtido foi utilizado para infectar *E. coli* DH5 α F'Iq, sem vetor, gerando uma eficiência de transfecção de pDESCP de $5,52 \times 10^7$ UFC/mL de extrato. Este é o valor do título de saída das partículas fágicas contendo pDESCP. Destarte, o resultado comprova a funcionalidade da região *Ori fl* de pDESCP e uma alta taxa de transfecção.

O extrato contendo as partículas virais com pDESCP possibilitou não somente a transfecção de *E. coli* DH5 α F'Iq, mas também de JM109, ambas linhagens produtoras do *pilus* sexual F. As mesmas partículas virais não foram capazes de transfectar as linhagens de *E. coli* DH5 α , DH10b, BL21(DE3) e K-12 (original), conforme esperado, pois estas não possuem o *pilus* sexual F. A análise microscópica de culturas de *E. coli* JM109 e DH5 α F'Iq transfectadas (figura 30) demonstrou uma morfologia filamentosa, reafirmando a funcionalidade de pDESCP. Este resultado também confirma, incontestavelmente, a eficiência de entrega e expressão da DNAzima *ftsZ* em *E. coli* formadoras de *pilus* sexual F.

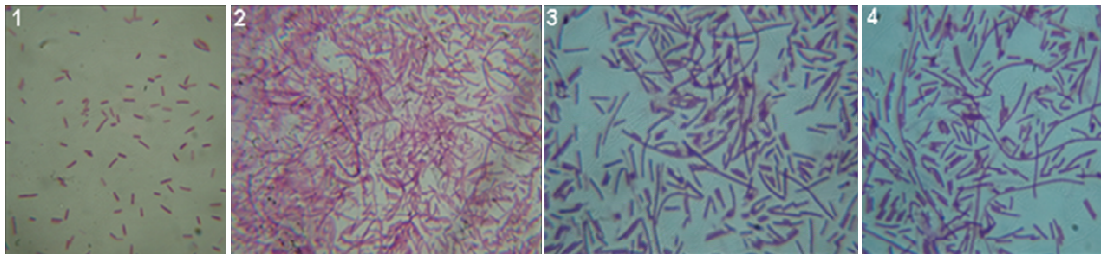
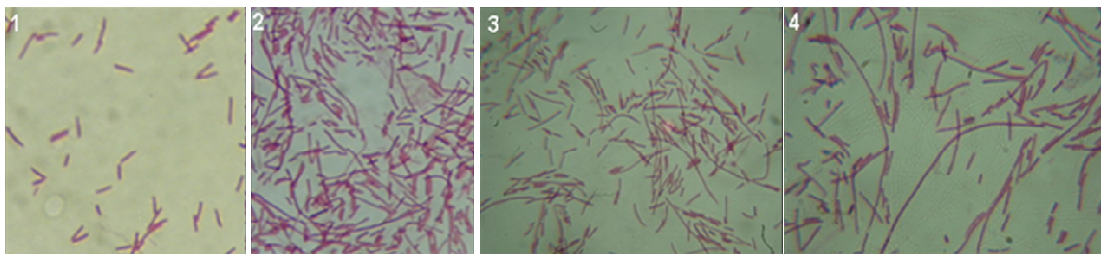
A - JM109**B - DH5 α F'Iq**

Figura 30. Transfecção em *E. coli*. A- *E. coli* JM109: 1- não transfectada; 2, 3 e 4 – transfectada. B- *E. coli* DH5 α F'Iq: 1- não transfectada; 2, 3 e 4 – transfectada.

O êxito em se transmitir, por meio de fagos, um replicon contendo um sistema capaz de produzir DNAzimas em *E. coli* constitui uma estratégia promissora para a fagoterapia. Caso se utilizem, neste protótipo, de uma DNAzima capaz de matar eficientemente estas bactérias isto representaria ainda uma importante ferramenta para diminuir a transmissão de genes de resistência entre *E. coli*. O fato de que ExPEC formadoras de *pilus F* estarem entre as principais responsáveis pela transferência horizontal de genes de patogenicidade para outras espécies de *E. coli* valida, *per si*, a importância deste trabalho.

Uma ressalva importante a se considerar é que o marcador de seleção usado no fagomídeo pDESCP é o gene de resistência à ampicilina. O marcador de resistência à ampicilina está entre os mais comuns usados em sistemas plasmidiais e está envolvido em seleção dos clones que foram transformados com os respectivos vetores. Uma futura aplicação do protótipo construído neste trabalho implicaria, primeiramente, na substituição deste marcador. É importante ressaltar o perigo de se trabalhar/manipular genes de resistência à antibióticos. Estes genes, quando dispersos no ambiente, podem vir a ser incorporados, direta ou indiretamente, por outras espécies, ampliando o espectro de resistência destas. Por conta disso, a utilização de um marcador de seleção é item necessário para uma aplicabilidade prática deste sistema.

6.5 DNazimas Contra o Transcrito dos Genes *alr* e *dadX*

6.5.1 DNazimas propostas

A estrutura secundária dos possíveis transcritos gênicos, assim como somente da ORF, dos genes *alr* e *dadX* podem ser visualizadas nas figuras 31 e 32.

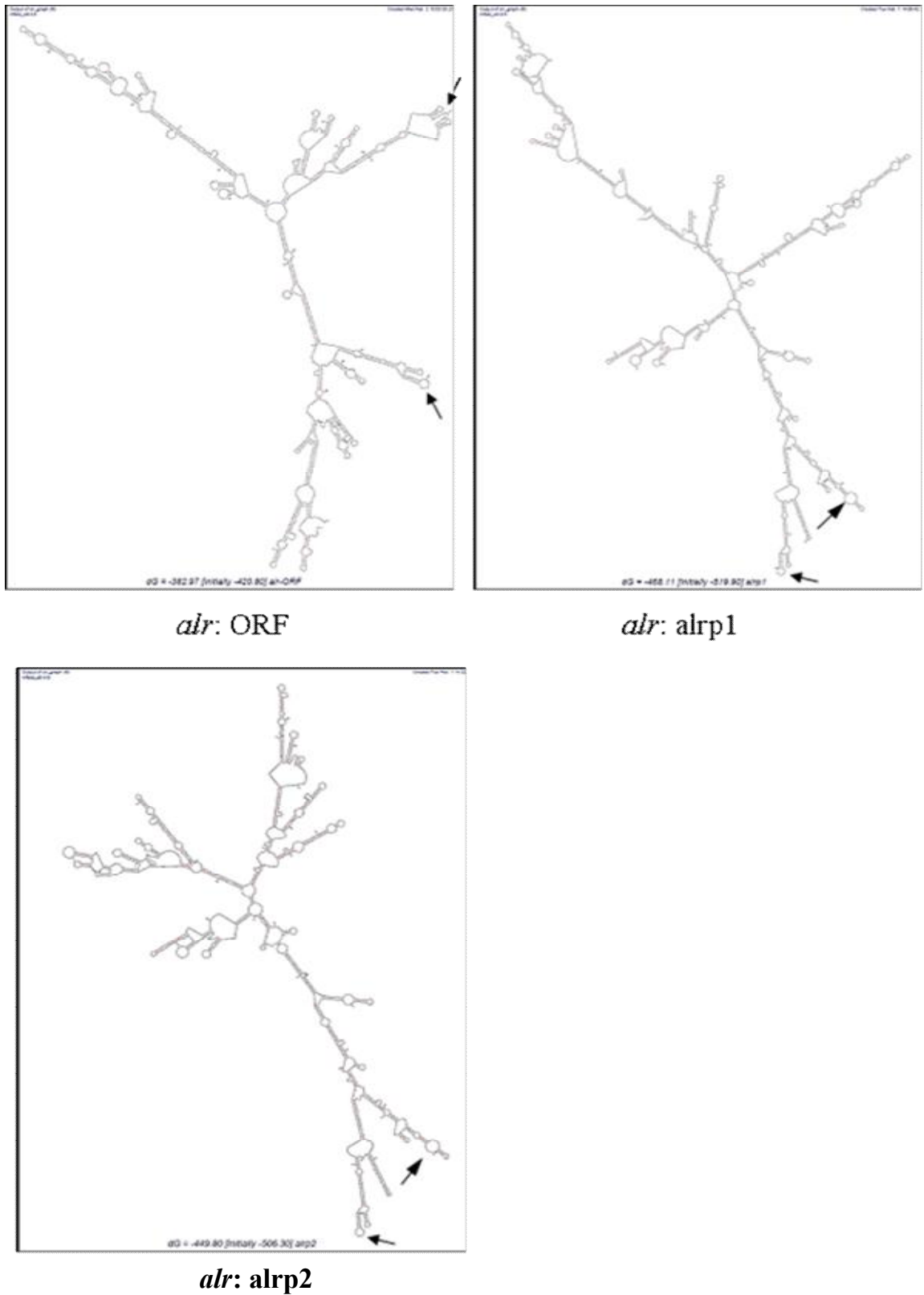


Figura 31. Projeções estruturais do transcrito do gene *alr*. Projeções da estrutura secundária do RNA do gene *alr*: da esquerda para a direita a projeção foi feita (i) a partir da ORF, (ii) do promotor alrp1 e (iii) do promotor alrp2.

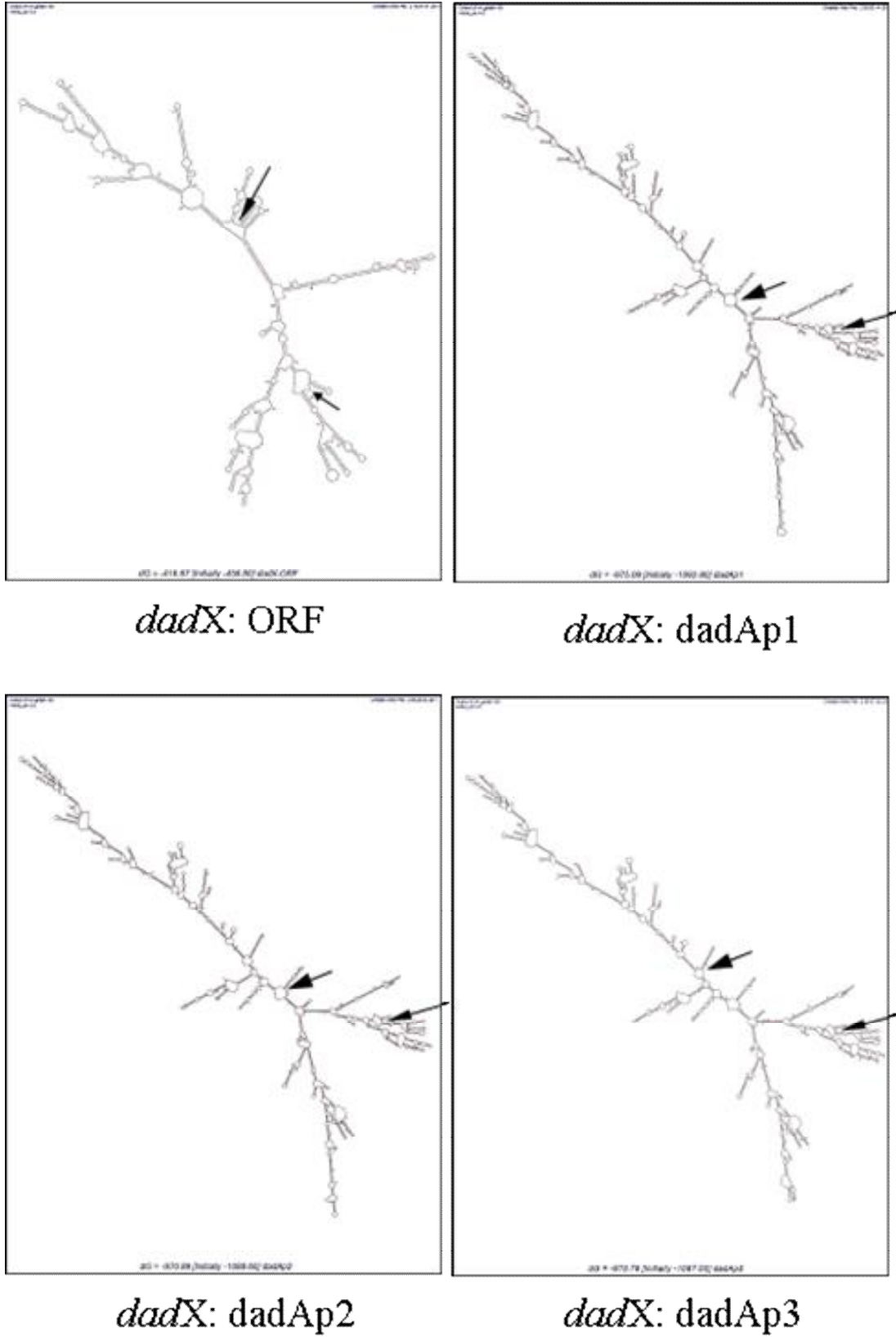


Figura 32. Projeções estruturais do transcrito do gene *dadX*. Projeções da estrutura secundária do RNA do gene *dadX*: da esquerda para a direita a projeção foi feita (i) a partir da ORF, (ii) do promotor *dadAp1*, (iii) do promotor *dadAp2* e (iv) do promotor *dadAp3*.

O objetivo em se comparar as diversas estruturas secundárias (apresentadas acima) para os transcritos de *alr* e *dadX* está no fato destes genes apresentarem mais de um promotor transcricional e a dinâmica da regulação de sua transcrição ainda não é bem entendida (ZHI *et al*, 1999; MENDOZA-VARGAS *et al*, 2009). Em tese, transcritos com diferentes tamanhos podem ser formados a partir desses promotores.

Independentemente do tamanho do transcrito gerado, esperava-se que a região referente à ORF de *alr* e *dadX* pudesse assumir, cada, uma conformação estrutural característica, com a presença de estruturas secundárias imutáveis. Infelizmente, isto não foi observado. Tal fato corrobora com as inúmeras influências que atuam para a conformação estrutural final de moléculas de RNA, relatadas por Zuker (2003). Neste caso, em especial, a própria variação de tamanho das cadeias polirribonucleotídicas de *alr* e *dadX* pode ser um fator preponderante para tal empecilho.

A enzima alanina racemase é a responsável pela racemização enzimática do aminoácido L-alanina para a forma D-alanina (WOOD, 2003). O aminoácido D-alanina é componente estrutural do ramo peptídico do peptidoglicano, que forma a parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em *E. coli*, assim como em todas as bactérias Gram negativas, existem duas isoformas da alanina racemase: uma com expressão constitutiva (codificada pelo gene *alr*) e outra com expressão regulada por L-alanina e leucina (*dadX*) (WALSH 1989; ŁOBOCKA *et al*, 1994; MATHEW *et al*, 1996; ZHI *et al*, 1999). A alanina racemase bacteriana é há muito tempo reconhecida como um alvo em potencial para a atuação de fármacos (WALSH 1989). Desenvolver estratégias coerentes que atuem contra a ação destes genes é considerado como sendo sempre algo promissor.

Neste trabalho, apesar de não terem sido encontradas regiões dentro da ORFs de *alr* e *dadX* que satisfizessem as condições mínimas necessárias para atuarem como alvos de DNazimas, alguns curtos segmentos, ainda assim, foram selecionados. É importante destacar que, de acordo com os critérios estabelecidos na metodologia deste trabalho, estas seqüências (candidatos a alvos) não são caracterizadas como regiões confiáveis, pois são curtas e espacialmente congestionadas dentro da estrutura secundária de seus respectivos RNAs. Este fato diminui a possibilidade delas hibridizarem com DNazimas. É válido ainda enfatizar que estas predileções são resultados de análises *in silico*, não condizendo, necessariamente, com as condições existentes *in vivo*.

No que se refere às seqüências alvo escolhidas, seguiu-se que para as três projeções realizadas para a ORF de *alr* foram identificados dois curtos segmentos. Nestas projeções, estes dois segmentos existem ocorrendo na forma de fita simples. Do mesmo modo, outros

dois curtos segmentos foram identificados nas quatro projeções realizadas para a ORF de *dadX*. Zuker (2003) relata que mesmo quando se observam potenciais “regiões alvo” na estrutura secundária de um transcrito, por meio de projeções *in silico*, estas não oferecem exatidão e não podem ser consideradas como totalmente confiáveis para atuarem como alvos. Zuker (2003) e Rasmussen *et al* (2007) relatam que a conformação secundária final de RNAs dependem, *in vivo*, de vários fatores, como temperatura, concentração de sais e interação (ou mesmo ligação) com proteínas intracelulares. Apesar desses empecilhos, as seqüências candidatas a alvos para DNazimas foram trabalhadas de modo a satisfazê-las como substratos para DNazimas (ver ANEXO A-1). Na tabela 2 estão descritas essas regiões.

Tabela 2. Alvos propostos para DNazimas sobre os transcritos dos genes *alr* e *dadX*. Os alvos encontram-se localizados no RNA dos genes *alr* e *dadX*.

| Alvo | Seqüência do alvo [substrato] (5'→3') | Posição no RNA do gene |
|--------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| RNA do gene <i>alr</i> | | |
| A-a1 | AACCUCCAGCCUGAUUG | 711↔727 |
| A-a2 | GUCGCGAAGUACCGAUU | 874↔891 |
| RNA do gene <i>dadX</i> | | |
| A-d1 | UAUUUUGUAUGGCGCUU3 | 630↔646 |
| A-d2 | GGAUUUUAUCUAAAAG | 354↔370 |

A tabela 3, a seguir, apresenta as DNazimas projetadas e testadas neste trabalho, assim como a indicação de seus respectivos alvos.

Tabela 3. DNazimas propostas. DNazimas propostas contra alvos localizados nos transcritos dos genes *alr* e *dadX*. A caixa cinza se refere ao motivo catalítico 10-23, que contém a seqüência conservada de 15nt, característica deste motivo.

| DNazima | Seqüência (5'→3') | Alvo da DNazima |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------|
| DZ _{alr-I} | CAATCAGGGGCTAGCTACAACGATGGAGGTT | A-a1 |
| DZ _{alr-II} | AATCGGTAGGCTAGCTACAACGATTCGCGAC | A-a2 |
| DZ _{dadX-I} | AAGCGCCAGGCTAGCTACAACGAACAAAATA | A-d1 |
| DZ _{dadX-II} | CTTTAAGAGGCTAGCTACAACGAAAATATCC | A-d2 |

De acordo com Abdelgany *et al* (2005), o tipo de encontro purina:pirimidina (Y:R) no substrato interfere significativamente na eficiência de clivagem das DNazimas 10-23. Estes autores postularam que o encontro Y:R, no substrato, que favorece uma maior eficiência de catálise segue a seguinte hierarquia: GU ≥ AU > GC >>> AC.

O encontro nucleotídico de clivagem de cada uma das DNAzimas propostas é: (i) $DZ_{alr-I} \rightarrow G:C$; (ii) $DZ_{alr-II} \rightarrow G:U$; (iii) $DZ_{dadX-I} \rightarrow A:U$; e (iv) $DZ_{dadX-II} \rightarrow A:U$. Somente DZ_{alr-I} apresentou um sítio de clivagem não tão favorável do ponto de vista catalítico; isto decorreu da restrição imposta pelo substrato A-a1.

Abdelgany *et al* (2005) relataram que DNAzimas com braços simétricos de comprimentos “10+10” e “13+13” (braço I + braço II) apresentaram uma maior eficiência de clivagem do que outras DNAzimas. Entretanto, quando estes autores testaram braços simétricos longos, especificamente com o comprimento de “21+21”, houve uma redução significativa dessa atividade. Outro fato constatado é que DNAzimas com braços assimétricos “9+13” (braço I+braço II) apresentaram uma maior atividade de catálise do que qualquer outra DNAzima contendo braços simétricos. Isto sugere que o braço II tem importante papel na estabilização da DNAzima. O inverso não foi constatado para braços 13+9.

6.5.2 Análise das DNAzimas projetadas

A subclonagem dos genes *alr* e *dadX*, de *E. coli*, foi necessário para as posterior produção dos seus respectivos transcritos, utilizados como substratos para as DNAzimas. O análise dos amplicons obtidos por meio dos oligonucleotídeos *alrEC-I/alrECII* e *dadXEC-I/dadXECII* confirmou as respectivas ampliações gênicas (figura 33).

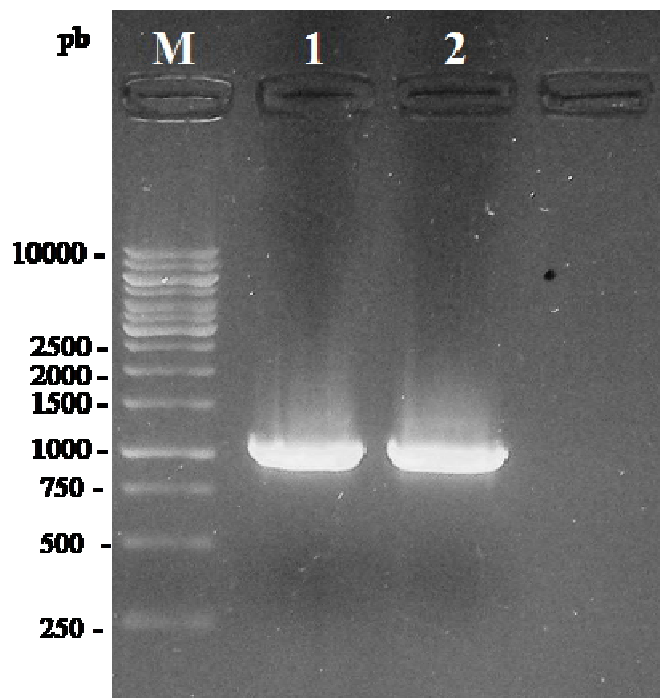


Figura 33. Amplificação da ORF dos genes *alr* e *dadX*, de *E. coli* K12. Genes *alr* e *dadX* de *E. coli* K12, amplificados por *alr*EC-I/*alr*EC-II e *dadX*EC-I/*dadX*EC-II, respectivamente. **M-** Marcador de tamanho molecular 1Kb; **1-** Amplicon de *alr*: 1.080pb; **2-** Amplicon *dadX*: 1.071pb.

A correta orientação das ORFs de *alr* e *dadX*, clonados à jusante do promotor T7, em vetores pGEM®-T Easy, formando, pGalr e pGdadX, respectivamente, foi devidamente confirmada por digestão com *Apa*I. Ambos os insertos podem, também, ser liberados de seus respectivos vetores por meio de digestão enzimática com *Apa*I e *Sal*I.

A partir dos vetores pGalr e pGdadX, conseguiu-se preparar satisfatoriamente os substratos dos genes *alr* e *dadX*, gerados por transcrição *in vitro*, de acordo como descrito na metodologia.

O ensaio cinético que buscou analisar a funcionalidade das DNazimas por meio de densitometria de bandas, tanto dos produtos formados quanto do substrato remanescente, (Método 1) não foi conclusivo! Não foi possível também detectar alterações desses RNAs quando o mesmo ainda foi analisado em gel desnaturante de poliacrilamida, corado com brometo de etídeo. Na tentativa de agregar massa de RNA ao gel de poliacrilamida e, com isso, facilitar a observação de possíveis alterações em sua concentração, utilizou-se todo o volume do ensaio enzimático (100µL). Apesar disto, nenhuma alteração significativa foi detectada/constatada (Fig. 35).

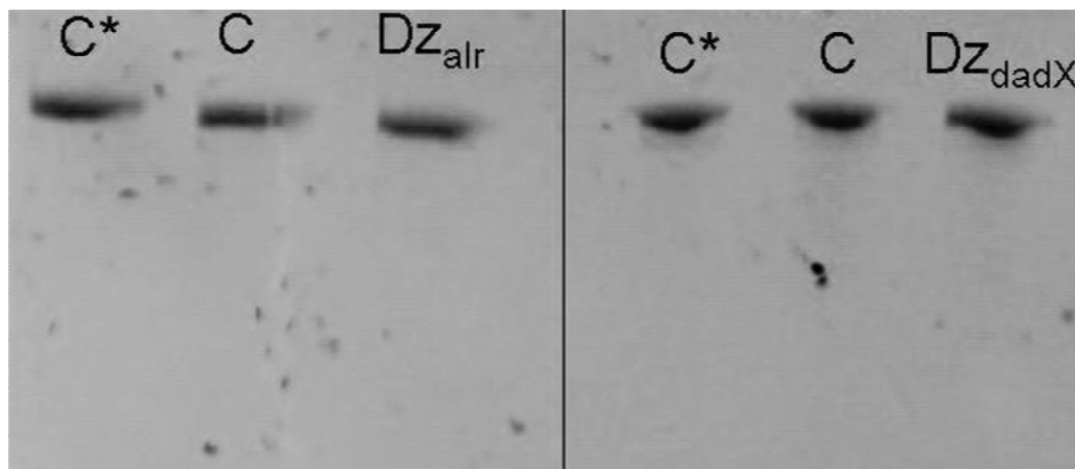


Figura 34. "Método 1", para a avaliação da funcionalidade das DNazimas. Substratos de RNA submetidos ao ensaio enzimático com as DNazimas Dz_{alr-1} e Dz_{dadX-1} , respectivamente. A reação ocorreu a 37°, por 60min, sendo, em seguida, analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 4% (ANEXO 18). Para o RNA do gene *alr*: **C*** - RNA controle (não foi incubado); **C** - reação controle, sem DNazima; **Dz_{alr}** - reação contendo a DNazima Dz_{alr-1} . Para o RNA do gene *dadX*: **C*** - RNA controle (não foi incubado); **C**: reação controle, sem DNazima; **Dz_{dadX}**: reação contendo a DNazima Dz_{dadX-1} .

Em ensaio prévio, para detecção da quantidade mínima de RNA observada na forma de bandas, constatou-se que o RNA de ambos os genes *alr* e *dadX* são visíveis a partir de 25ng, como destacado na figura 35.

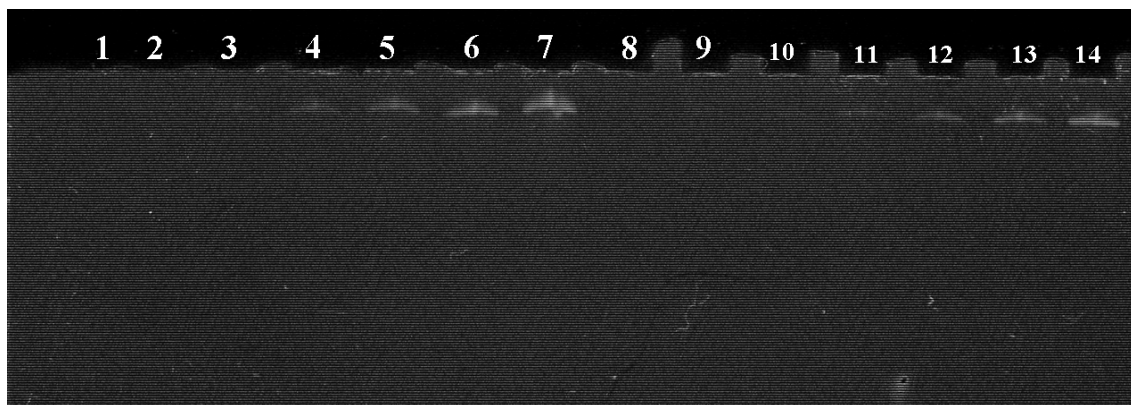


Figura 35. Ensaio para detecção de RNA em gel de poliacrilamida corado com brometo de etídeo. Detecção do RNA dos genes *alr* e *dadX*. Quantidades testadas do RNA de *dadX*: **1-** 1ng; **2-** 5ng; **3-** 10ng; **4-** 25ng; **5-** 50ng; **6-** 100ng; **7-** 200ng. Quantidades testadas do RNA de *alr*: **8-** 1ng; **9-** 5ng; **10-** 11ng; **11-** 25ng; **12-** 50ng; **13-** 100ng; **14-** 200ng.

A estratégia da realização de um ensaio cinético com volume de reação de 100 μ L (ANEXO A-8) surgiu como alternativa de aumentar a massa do RNA da amostra, a ser

analisada em gel. Sabe-se que o brometo de etídeo liga-se ao RNA com menor afinidade do que o faz com DNA (Sambrook *et al*, 1989) oferecendo, deste modo, uma menor sensibilidade na resolução. A quantidade total de RNA mensurada para os 100 μ L de reação foi de 105,42 ng de RNA *alr* e 104,34 ng de RNA *dadX*. Apesar das inúmeras tentativas, não foi possível a obtenção de dados conclusivos sobre os respectivos ensaios, por meio desta metodologia. Reações em volumes abaixo de 50 μ L não ofereceram boa resolução/nitidez das bandas visualizadas em gel. Joyce (2001) afirma que o K_M ideal para um substrato de RNA, em um ensaio cinético envolvendo DNazima, é $< 1nM$. Essa concentração tão baixa de substrato somente poderia ser detectada por uma metodologia de maior sensibilidade, que pudesse, de alguma forma, detectar estas moléculas de RNA. Como exemplo desta outra metodologia temos o emprego de radionucleotídeos.

A análise das DNazimas por meio da quantificação residual de seus respectivos substratos de RNA (Método 2) também não gerou resultados conclusivos para este trabalho (figura 36). A quantificação destes substratos por meio de duas rodadas de amplificação, uma envolvendo a reação de transcrição reversa e a outra por PCR, não demonstraram ser sensíveis para tal análise. É importante mencionar que o “método 2” é um método qualitativo, desenvolvido para avaliar a degradação dos substratos de RNA após os respectivos ensaios enzimáticos. Cogitamos quatro hipóteses possíveis para o insucesso deste método: (i) Ambas as reações (transcrição reversa e a PCR) acabaram por equacionar a massa dos amplicons. Estes últimos foram derivados a partir de uma massa inicial de substrato de RNA, obtida ao final de cada ensaio cinético; (ii) a degradação do RNA foi ínfima e, portanto, insensível para ser detectada por este método; (iii) há a necessidade em se fazer mais diluições seriadas do substrato inicial de RNA, adquirido ao final de cada ensaio cinético. Isto poderia gerar diferença qualitativa (observável) no amplicon final; ou (iv) realmente não houve degradação dos substratos por suas respectivas DNazimas.

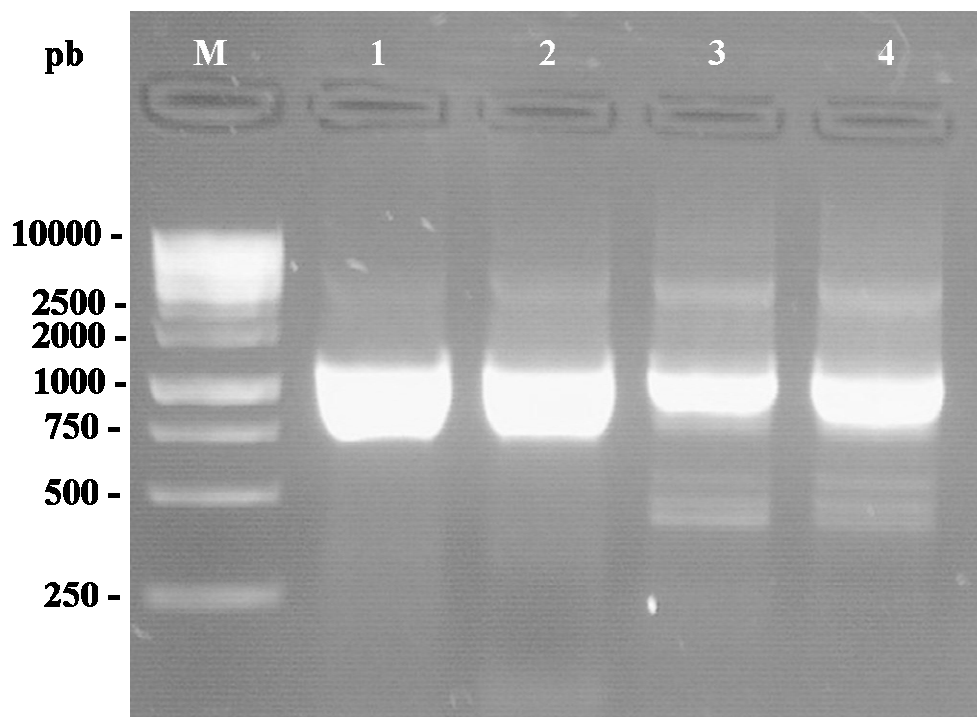


Figura 36. "Método 2", para a avaliação da funcionalidade das DNazimas. Amplificação dos substratos de RNA após duas rodadas de reações: (i) transcrição reversa e (ii) PCR. **M-** marcador de tamanho molecular de 1Kb. **1- Controle:** amplicon gerado a partir do RNA *alr* sem contato com DNazima; **2- amplicon gerado a partir da incubação do RNA *alr* com Dz_{alr-II} .** **3- Controle:** amplicon gerado a partir do RNA *dadX* sem contato com DNazima; **4- amplicon gerado a partir da incubação do RNA *alr* com $Dz_{dadX-II}$.**

De fato, para se ter uma diferença visual (qualitativa) significativa na concentração dos amplicons finais, os substratos devem estar inicialmente em nível muito baixo. Isto implica na necessidade de se realizar diluições seriadas do substrato antes de usá-lo como molde para amplificação nas reações de transcrição reversa e PCR, respectivamente. Deve-se atentar ainda para padronização mínima dos ciclos da PCR. Uma quantidade adequada de ciclos permite, além da detecção da do amplicon em gel de agarose, informações sobre a quantidade inicial do substrato de RNA. Se comparado ao RNA controle (que não foi incubado com a respectiva DNazima), pode-se ter uma idéia do nível de degradação do mesmo. Esta técnica é a base para se analisar os níveis de expressão gênica por "PCR em tempo real", contudo, em um nível semi-automatizado. É válido mencionar que a "metodologia padrão" para a avaliação cinética de DNazimas que degradam RNAs é realizada com o uso de radionucleotídeos. Esta última metodologia não foi utilizada neste trabalho!

A intenção em se avaliar qualitativamente as DNazimas com alvos sobre os transcritos dos genes *alr* e *dadX* surgiu como abordagem inicial, rápida e necessária, para que as mesmas pudessem ser inseridas no sistema de expressão de DNazima (pDESCP),

desenvolvido neste trabalho. O uso de DNazimas mais letais contra *E. coli*, e produzidas a partir deste sistema, tornariam nosso estudo mais completo no campo da fagoterapia, pois, o protótipo envolveria a entrega de um replicon, a partir de M13, que seria capaz de produzir DNazimas que, de fato, matariam *E. coli*.

A enzima alanina racemase bacteriana é um alvo muito atrativo para o desenvolvimento de fármacos que impeçam sua ação, pois isto desestabilizaria o peptidoglicano e a bactéria se romperia, haja vista que uma de suas funções é a manutenção de uma pressão osmótica interna (que é cerca de 20 vezes maior dentro da célula do que do lado de fora), responsável pela organização química que compatibiliza a vida nestes microrganismos (HÖLTJE, 1998; HUANG *et al*, 2008).

A alanina racemase codificada por *alr* é constitutiva e serve a uma função anabólica na montagem do peptidoglicano com cerca de 200 moléculas de enzimas/célula (DAUB, 1986). A outra racemase, codificada por *dadX*, é induzida e requerida para o crescimento celular a partir de L-alanina e também leucina. A presença intracelular de 40 moléculas/célula da alanina racemase catabólica alcança 95% do fluxo catalítico do que a alcançada pela racemase anabólica, uma vez que sua V_{max} é 60 vezes maior do que esta última (GALAKATOS *et al*, 1986). A base para esta diferença da curva da V_{max} de 60 vezes é até agora pouco compreendida. Experimentos realizados com *E. coli* K-12 também mostraram que quando células foram crescidas em presença de L-alanina o produto do gene *dadX* (a alanina racemase catabólica de *E. coli*) compreendeu mais do que 95% de toda a atividade celular da alanina racemase celular (WILD *et al*, 1985). Neste caso a D-alanina produzida é também convertida em piruvato e amônia através de uma desaminação oxidativa realizada pela D-alanina desidrogenase (WILD *et al*, 1985; ŁOBOCKA *et al*, 1994) e, por conseguinte, a descarboxilação oxidativa do piruvato para acetato, CO₂ e dois elétrons (através da piruvato oxidase) (WALSH, 1989; ŁOBOCKA *et al*, 1994).

Estudos têm mostrado que o *knokout* de um ou outro gene da alanina racemase (*alr* ou *dad B*) produz silenciosamente D-alanina suficiente para a biossíntese de peptidoglicano (cerca de 8×10^6 moléculas de D-alanina/célula/geração (GALAKATOS *et al*, 1986)), entretanto, duplos mutantes exibem o fenótipo antecipado de requerimento de D-alanina exógena para crescer (WALSH, 1989). Baseados nestes resultados, buscou-se projetar duas DNazimas com alvos sobre os genes das duas isoformas de alanina racemase de *E. coli* e, desta forma, promover uma diminuição intracelular de D-alanina, por conseguinte comprometendo a viabilidade desta bactéria. A busca por DNazimas cataliticamente funcionais contra os transcritos gênicos de alanina racemase de *E. coli* permitirá o

desenvolvimento de dois novos cassetes de expressão contendo estas DNAzimas, e que serão inseridos em pDESCP, tornando-o mais agressivo contra esta espécie.

Neste trabalho, sugere-se que para projetar, avaliar e validar as melhores DNAzimas é necessário, inicialmente, dispor de mecanismos que sejam sensíveis o bastante para detectar a clivagem dos seus substratos. Apesar de que os radionucleotídeos sejam ainda considerados como um método “padrão ouro” para esta finalidade, apontamos para o uso do PCR em tempo real como uma alternativa viável, possível e mais segura, para se avaliar DNAzimas. Outro questão a ser levada em consideração é o emprego de “bibliotecas de DNAzimas” para cada transcrito de RNA que se deseja alvejar (silenciar). Esta necessidade surge da imprecisão sobre a correta (ou real) estrutura secundária das moléculas de RNA. Por mais que algoritmos matemáticos tendam a projetar estruturas secundárias de RNA muito próximas do real, desenhar ou projetar DNAzimas a partir destas estruturas não gera confiabilidade! Rasmussen *et al* (2007) relata que o método mais adequado seria testar as DNAzimas em um “extrato celular livre de células”, pois, deste modo, estariam presentes na reação todos os possíveis interferentes comuns da célula. Outro detalhe é que a atividade a cinética destas moléculas estaria sendo testada no ambiente real.

■ ■ ■



CONCLUSÃO E **PERSPECTIVAS**



Concluimos que o sistema de expressão de DNazimas, contido em pDESCP, apresentou-se bastante eficiente no que se referiu à produção de da DNazima *ftsZ*. Esse fagomídeo é também hábil para ser devidamente encapsulado pelo envoltório do fago M13. Dadas estas características, esse sistema constitui um excelente modelo para atuar como um protótipo de biofármaco, com potencial implicação no controle da transmissão de genes, ou regiões, de patogenicidade entre *E. coli* extraintestinais (ExPEC). Contudo, a utilização deste protótipo com fins terapêuticos, ou ainda, voltado para a indústria de alimentos, implica na necessidade de substituição do marcador de resistência à ampicilina e na inserção de DNazimas letais para *E. coli*. Isto transformaria pDESCP em um sistema bactericida, ao invés de bacteriostático. Desde que satisfeitos estes requisitos, pDESCP pode ainda integrar *cocktails* de bacteriófagos, utilizados em fagoterapia.

Uma parte do trabalho desenvolvido nesta tese foi organizado na forma de um artigo científico, que está sendo transcrito para o idioma inglês. Assim que concluída a tradução, este artigo será enviado a uma revista científica especializada para apreciação.

Em um momento anterior foi elaborado um artigo de revisão, intitulado “Genetics, Structure and Function of Alanine Racemases in Bacteria and their Role in Peptidoglycan Production”, com autoria de: Hugo Valério Corrêa de Oliveira; Elisabete José Vicente; Spartaco Astolfi Filho; e Edmar Vaz de Andrade. Este artigo de revisão foi submetido ao corpo editorial da revista “Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology”, contudo, o mesmo foi rejeitado. A análise dos revisores apontou retificações necessárias ao texto. Estes ajustes estão sendo realizados com o intuito de ainda publicar o mesmo em outra revista da área.

Há grandes perspectivas para aprimorar ainda mais o fagomídeo pDESCP. Como mencionado anteriormente, buscar-se-á o desenvolvimento de DNazimas letais contra *E. coli*. Isto tornaria o protótipo mais promissor sob o ponto de vista funcional e também de mercado. Há grandes pretensões de se iniciar uma linha de pesquisa com fagos no Estado do Amazonas, com foco direcionado para a terapêutica microbiana!

■ ■ ■



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ABE, H.; YOSHIKAWA, N.; SAROQER, M. G.; OKADA, S. Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28(9), p. 1571-1577, 2005.

ABDELGANY, A.; UDDIN, M. K.; WOOD, M.; TAIRA, K.; BEESON, D. Design of efficient DNazymes against muscle AChR α -subunit cRNA *in vitro* and in HEK 293 cells. *Journal of RNAi and Gene Silencing*, v. 1(2), p. 88-96, 2005.

ACKERMANN, H-W. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, v. 1, p. 90-94, 2011.

AGRAWAL, S.; TEMSAMANI, J.; TANG, J. Y. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88(17), p. 7595-7599, 1991.

ALLEN Jr., G. C.; DIXON, N. E.; KORNBERG, A. Strand switching of replicative DNA helicase promoted by the E. coli primosome. *Cell*, 74: 713-722, 1993.

ALLISON, D. P.; GANESAN, A. T.; OLSON, A. C.; SNYDER, C. M.; MITRA, S. Electron microscopic studies of bacteriophage M13 DNA replication. *Journal of Virology*, v. 24(2), p. 673-684, 1977.

ARAP, M. A. Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28(1), p. 1-9, 2005.

ARUTYUNOV, D.; ARENSON, B.; MANCHAK, J.; FROST, L. S. F Plasmid TraF and TraH Are Components of an Outer Membrane Complex Involved in Conjugation. *Journal of Bacteriology*, v. 192(6), p. 1730-1734, 2010.

ATHERTON, F. R.; HASSALL, C. H.; LAMBERT, R. W. Synthesis and structure-activity relationships of antibacterial phosphonopeptides incorporating (1-aminoethyl)phosphonic acid and (aminomethyl)phosphonic acid. *J. Med. Chem.*, v. 29, p.29-39, 1986.

BADET, B.; INAGAKI, K.; SODA, K.; WALSH, C. T. Time-dependent inhibition of *Bacillus stearothermophilus* alanine racemase by (1-aminoethyl)phosphonate isomers by isomerization to noncovalent slowly dissociating enzyme-(1-aminoethyl)phosphonate complexes. *Biochemistry*, v. 25, p. 3275-3282, 1986.

BADET, B.; WALSH, C. Purification of an alanine racemase from *Streptococcus faecalis* and analysis of its inactivation by (1-aminoethyl)phosphonic acid enantiomers. *Biochemistry*, v. 24, p.1333-1341, 1985.

BAUM, D. A.; SILVERMAN, S. K. Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 65, p. 2156-2174, 2008.

BÉLANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C.M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 62, p. 1–10, 2011.

BENSON, V.L., KHACHIGIAN, L.M., and LOWE, H.C. DNazymes and cardiovascular disease. *Br. J. Pharmacol.*, v. 154, p. 741–748, 2008.

BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A. N.; POWELL, B.; CARLTON, R.; MERRIL, C. R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, v. 70, p. 204-210, 2002.

BREAKER, R. R. & JOYCE, G. F. A DNA enzyme with Mg(2+)-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem Biol*, v. 2(10), p. 655-660, 1995.

BREAKER, R.R.; JOYCE, G.F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.*, v. 1, p. 223–229, 1994.

BREITLING, F.; DÜBEL, S.; SEEHAUS, T.; FUCHS, P.; BRAUNAGEL, M.; KLEWINGHAUS, I.; LITTLE, M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, v. 104, p. 147-153, 1991.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 26, p. 44-51, 2002.

BROXMEYER, L.; SOSNOWSKA, D.; MILTNER, E.; CHACÓN, O.; WAGNER, D.; McGARVEY, J.; BARLETTA, R.G.; BERMUDEZ, L.E. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis*, v. 186, p. 1155-1160, 2002.

BRUNING JB, MURILLO AC, CHACON O, BARLETTA RG, SACCHETTINNI JC: Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine: D-alanine ligase, a target of the antituberculosis drug D-cycloserine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55(1):291-301.

BRÜSSOW, H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology*, v. 151, p. 2133-2140, 2005.

BRÜSSOW, H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology*, v. 434, p. 138–142, 2012.

CAMPBELL, J. M.; BACON, T. A.; WICKSTROM, E. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 20, p. 259-267, 1990.

CAO, J.; SUN, Y.; BERGLINDH, T.; MELLGARD, B.; LI, Z.; MARDH, B.; MARDH, S. *Helicobacter pylori*-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth. *Biochem Biophys Acta*, v. 1474, p. 107–113, 2000.

CABEEN, M. T.; CHARBON, G.; VOLLMER, W.; BORN, P.; AUSMEES, N.; WEIBEL, D. B.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell curvature through mechanical control of cell growth. *The EMBO Journal*, v. 28 (9), p. 1208–1219, 2009.

CARLTON, R. M. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsaw)*, v. 46, p. 267-274, 1999.

CECH, T. R.; ZAUG, A. J.; GRABOWSKI, P. J. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, v. 27, p. 487-496, 1981.

CHANG, F.; HUANG, K. C. How and why cells grow as rods. *BCM Biology*, v. 12:54, doi:10.1186/s12915-014-0054-8, 2014.

CHARBON, G.; CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, CHRISTINE. Bacterial intermediate filaments: *in vivo* assembly, organization, and dynamics of crescentin. *Genes & Development*, v. 23, p. 1131–1144, 2009.

CHEN, Y. A novel single -strand DNA expression vector. *Expert Opin. Biol. Ther.*, v. 2(7), p.735-740, 2002.

CHEN, X.; DUDGEON, N.; SHEN, L.; WANG, J. H. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov. Today*, v. 10, p. 587-593, 2005.

CHEN, Y.; JI, Y-J.; CONRAD, C. Expression of ssDNA in mammalian cells. *Biotechniques*, v. 34, p. 167-171, 2003.

CHEN, Y.; JI, Y-J.; ROXBY, R.; CONRAD, C. In vivo expression of single -strand DNA in mammalian cells with DNA enzyme sequences targeted to C-raf. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, v. 10, p. 415-422, 2000.

CHEN, Y. & McMICKEN, H. W. Intracellular production of DNA enzyme by a novel single stranded DNA expression vector. *Gene Therapy*, v. 10, p. 1776-1780, 2003.

CHEN, F.; WANG, R.; LI, Z.; LIU, B.; WANG, X.; SUN, Y.; HAO, D.; ZHANG, J. A novel replicating circular DNAzyme. *Nucleic Acids Research*, v. 32(8), p. 2336 -2341, 2004.

CHEN, Y-R.; YANG, T-Y.; LEI, G-S.; LIAO, C-C.; CHAK, K-F. Interaction of colicin E7 with the major coat protein (g8p) may confer limited protection on colicinogenic *Escherichia coli* against M13 bacteriophage infection. *Microbiology*, v. 156, p. 3379–3385, 2010.

CHENG, Y. Q.; WALTON, J. D. A eukaryotic alanine racemase gene involved in cyclic peptide biosynthesis. *J Biol Chem*, v. 275, p. 4906-4911, 2000.

CHESNOKOVA, O. N.; McPHERSON, S. A.; STEICHEN, C. T.; TURNBOUGH-JR, C. L. The spore-specific alanine racemase of *Bacillus anthracis* and its role in suppressing germination during spore development. *Journal of bacteriology*, v. 191(4), p1303-1310, 2009.

CHOPRA, I.; STOREY, C.; FALLA, T. J.; PEARCE, J. H. Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited. *Microbiology*, v. 144, p. 2673-2678, 1998.

CLICK, E. M.; WEBSTER, R. E. Filamentous phage infection: required interactions with the Tola protein. *J Bacteriol*, v. 179, p. 6464–6471, 1997.

COUÑAGO, R. M.; DAVLIEVA, M.; STRYCH, U.; HILL, R. E.; KRAUSE, K. L. Biochemical and structural characterization of alanine racemase from *Bacillus anthracis* (Ames). *BMC Structural Biology*, v. 9(53), p. 1-15, 2009.

COPIE, V.; FARACI, W. S.; WALSH, C. T.; GRIFFIN, R. G. Inhibition of alanine racemase by alanine phosphonate: detection of an imine linkage to pyridoxal 5'-phosphate in the enzyme-inhibitor complex by solid-state ¹⁵N nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, v. 27, p.4966-4968, 1988.

CROOKE, R. M.; GRAHAM, M. J.; MARTIN, M. J.; LEMONIDIS, K. M.; WYRZYKIEWIECS, T.; CUMMINS, L. L. Metabolism of antisense oligonucleotides in rat liver homogenates. *J. Pharmacol Exp Ther*, v. 292(1), p. 140-149, 2000.

CRUZ, R. P. G.; WITHERS, J. B.; LI, Y. Dinucleotide junction cleavage versatility of 8 - 17 deoxiribozyme. *Chem Biol*, v. 11(1), p. 57–67, 2004.

DALLAS, A.; VLASSOV, A. V. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potencial. *Med Sci Monit*, v. 12(4): RA67-74, 2006.

DASS, C.R., CHOONG, P.F., and KHACHIGIAN, L.M. DNzyme technology and cancer therapy: cleave and let die. *Mol. Cancer Ther.*, v. 7, p. 243–251, 2008.

DATTA, H. J.; GLAZER, P. M. Intracellular generation of single-strand DNA for chromosomal triplex formation and induced recombination. *Nucleic Acid Res.*, v. 29, p. 5140-5147, 2001.

DAUB, E. Biochemistry and genetics of D-alanine metabolism in *Salmonella typhimurium*. Ph.D. dissertation, Massachusetts Institute of Technology, USA, 1986.

DAVID, S. Synergic activity of D-cycloserine and β -chloro-D-alanine against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, p. 203-206, 2001.

DENG, L-W.; PERHAM, R. N. Delineating the Site of Interaction on the pIII Protein of Filamentous Bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, v. 319, 603–614, 2002.

D'HERELLE, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, v. 165, p. 373-375, 1917.

DIAS, R. S. Isolamento, purificação e caracterização molecular de bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* causadora de mastite bovina. Tese, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Brasil, p. 63, 2011.

DODATKO, T.; AKOACHERE, M.; MUEHLBAUER, S. M.; HELFRICH, F.; HOWERTON, A.; ROSS, C.; WYSOCKI, V.; BROJATSCH, J.; ABEL-SANTOS, E. Bacillus cereus spores release alanine that synergizes with inosine to promote germination. *PLoS ONE*, v. 4(7), e6398, 2009.

DOERFLER, W.; OREND, G.; SCHUBBERT, R.; FECHTELER, K.; HELLER, H.; WILGENBUS, P.; SCHROER, J. On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes: mechanism and consequences. *Gene*, v. 157, p. 241-245, 1995.

DONINI, S. Molecular and biochemical characterization of pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes of unknown function. Ph.D. dissertation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, Italy, 2007.

DUBOS, R. J.; STRAUS, J. H.; PIERCE, C. The multiplication of bacteriophage *in vivo* and its protective effects against experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *J Exp Med*, v. 20, p. 161-168, 1943.

DUNCAN, K.; FARACI, W. S.; MATTESON, D. S.; WALSH, C. T. (1-Aminoethyl)boronic acid: a novel inhibitor for *Bacillus stearothermophilus* alanine racemase and *Salmonella typhimurium* D-alanine:D-alanine ligase (ADP-forming). *Biochemistry*, v. 28, p. 3541-3549, 1989.

EDER, P. S.; DeVine, R. J.; DAGLE, J. M.; WALDER, J. A. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Summer*, v. 1(2), p. 141-151, 1991.

EDGAR, R.; FRIEDMAN, N.; MOLSHANSKI-MOR, S.; QIMRON, U. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78(3), p. 744-751, 2012.

EKLAND, E. H. & BARTEL, D. P. The secondary structure and sequence optimization of an RNA ligase ribozyme. *Nucleic Acids Res.*, v. 23, p. 3231-3238, 1995

ESAKI, N.; WALSH, C. T. Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: purification and characterization of the enzyme encoded by the *alr* gene. *Biochemistry*, v. 25, p. 3261-3267, 1986.

EVANS, A.C. Inactivation of antistreptococcus bacteriophage by animal fluids. *Public Health Reports*, v. 48, p. 411-426, 1933

FARACI, W. S.; WALSH, C. T. Racemization of alanine by the alanine racemases from *Salmonella typhimurium* and *Bacillus stearothermophilus*: energetic reaction profiles. *Biochemistry*, v. 27, p. 3267-3276, 1988.

- FENG, Z. & BARLETTA, R. G. Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47(1), p. 283-291, 2003.
- FERRARI, E.; HENNER, D.; YANG, M. Isolation of an alanine racemase gene from *Bacillus subtilis* and its use for plasmid maintenance in *B. subtilis*. *Biotechnology*, v. 3, p. 1003-1007, 1985.
- FEUCHT, A. & ERRINGTON, J. *ftsZ* mutations affecting cell division frequency, placement and morphology in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, v. 151, p. 2053–2064, 2005.
- FILLOUX, A. A variety of bacterial pili involved in horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.*, v. 192(13), 3243-3245, 2010.
- FINKEL, F. DNA cuts its teeth --as an enzyme. *Science*, v. 286 (5449), p. 2441-2442, 1999.
- HÖBARTNER, C. & SILVERMAN S. K. Recent advances in DNA catalysis. Review, *Biopolymers*, v. 87(5-6), p. 279-292, 2007.
- FIRTH, N.; IPPEN-IHLER, K.; SKURRAY, R. A. (1996). Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. p. 2377-2401. In: Neidhardt, F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Jr., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H.E. (Eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2a Ed, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- FLUITER, K.; FRIEDEN, M.; VREIJLING, J. KOCH, T.; BAAS, F. Evaluation of LNA modified DNazymes targeting a single nucleotide polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Oligonucleotides*, v. 15, p. 246-254, 2005.
- FROST, L. S.; IPPENIHLER, K.; SKURRAY, R. A. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev*, v. 58, p. 162–210, 1994.

GALAKATOS, N. G.; DAUB, E.; BOTSTEIN, D.; WALSH, C. T. Biosynthetic Alr alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA and protein sequence determination. *Biochemistry*, v. 25, p. 3255-3260, 1986.

GALLI, E.; GERDES, K. FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 194(2), p. 292-302, 2012.

GEIER, M. R.; TRIGG, M. E.; MERRIL, C. R. The fate of bacteriophage lambda in non-immune germfree mice. *Nature*, v. 246, p. 221-223, 1973.

GUO S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, v.81, p.611-620, 1995.

GUVAKOVA, M. A.; YAKUBOV, L. A.; VLODAVSKY, I.; TONKINSON, J. L.; STEIN, C. A. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 2620-2627, 1995.

HANKIN, E. H. L'action bactericide des eaux de la Jumma et du Gange sur le microbe du Choléra. *Ann. Inst. Paster*, v. 10, p. 511-523, 1896.

HASELOFF, J.; GERLACH, W. L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, v. 334(6183), p. 585-591, 1988.

HEATON, M. P.; JOHNSTON, R. B.; THOMPSON, T. L. Controlled lysis of bacterial cells utilizing mutants with defective synthesis of D-alanine. *Can. J. Microbiol.*, v. 34, p. 256-261, 1988.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN, B. M. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* in a field trial. *Can J Microbiol*, v. 48, p. 256-261, 2002.

HENRY, S. P.; TEMPLIN, M. V.; GILLET, N.; ROJKO, J.; LEVIN, A. A. Correlation of toxicity and pharmacokinetic properties of a phosphorothioate oligonucleotide designed to inhibit ICAM-1. *Toxicol Pathol*, v. 27(1), p. 95-100, 1999.

HOFFMANN, K.; SCHNEIDER-SCHERZER, E.; KLEINKAUF, H.; ZOCHER, R. Purification and characterization of eukaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporine biosynthesis. *J Biol Chem*, v. 269, p. 12710-12714, 1994.

HÖLTJE, J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol*, v. 62, p. 181-203, 1998.

HOVIG, E.; MAELANDSMO, G.; MELLINGSAETER, T.; FODSTAD, O.; MIELEWCZYK, S. S.; WOLFE, J.; GOODCHILD, J. Optimization of hammerhead ribozymes for the cleavage of S100A4 (CAPL) mRNA. *Antisense Nucleic Acids Drug Dev*, v. 11(2), p. 67-75, 2001.

HUANG, K. C.; MUKHOPADHYAY, R.; WEN, B.; GITAI, Z.; WINGREEN, N. S. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *PNAS*, v. 105(49), p. 19281-19287, 2008.

IVERSEN, P. *In vivo* studies with phosphorothioate oligonucleotides: pharmacokinetics prologue. *Anticancer Drug Des*, v. 6(6), p. 531-538, 1991.

JAEGER, L. The new world of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 7, p. 324-335, 1997.

JAMINDAR, D.; GUTHEIL, W. G. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for Marfey's derivatives of L-Ala, D-Ala, and D-Ala-D-Ala: application to the *in vivo* confirmation of alanine racemase as the target of cycloserine in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, v. 396, p. 1-7, 2010.

JENNE, S.; BREPOELS, K.; COLLEN, D.; JESPER, L. High resolution mapping of the B cell epitopes of staphylokinase in humans using negative selection of a phage-displayed antigen library. *J Immunol*, v. 161, p. 3161-3168, 1998.

JIANG, D.; XU, J.; SHENG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, J. An allosteric DNazyme with dual RNA-cleaving and DNA-cleaving activities. *FEBS Journal*, v. 277, p. 2543-2549, 2010.

JOYCE, G. F. RNA: cleavage by the 10-23 DNA enzyme. *Methods Enzymol*, v. 341, p. 503-517, 2001.

JOHNSON, T. J.; LISA K. NOLAN, L. K. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 73(4), p. 750–774, 2009.

KABULI, M.; YIN, A. L.; TOBAL, K. Targeting PML/RARalpha transcript with DNazymes result in reduction of proliferation and induction of apoptosis in APL cells. *The Hematology Journal*, v. 5, p. 426-433, 2004.

KATRIB, M. The malarial carbamoyl phosphate synthetase II gene as a target for DNzyme therapy. Tese, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences: University of New South Wales-Australia, 2007.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews: Microbiology*, v.2, p. 123-140, 2004.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ, 8 Ed., 2003.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell*, v. 91, p. 511–520, 1997.

KORE, A. R.; CAROLA, C.; ECKSTEIN, F. Attempts to obtain more efficient GAC-cleaving hammerhead ribozymes by *in vitro* selection. *Bioorg Med*, v. 8, p. 1767-1771, 2000.

KULLIK, I.; JENNI, R.; BERGER-BÄCHI, B. Sequence of the putative alanine racemase operon in *Staphylococcus aureus*: insertional interruption of this operon reduces D-alanine substitution of lipoteichoic acid and autolysis. *Gene*, v. 219, p.9-17, 1998.

KURRECK, J.; BIRGIT, B.; JALMEL, R.; ERDMANN, V. A. Comparative study of DNA enzyme and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 7099-7107, 2002.

- KURRECK, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eu J Biochem*, v. 270 (8), p. 1628-1644, 2003.
- LAN, G.; DANIELS, B. R.; DOBROWSKY, T. M.; WIRTZ, D.; SUN, S. X. Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *PNAS*, v. 106 (1), p. 121–126, 2009.
- LAROCCA, D.; BURG, M. A.; JENSEN-PERGAKES, K.; RAVEY, E. P.; GONZALEZ, A. M.; BAIRD, A. Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr Pharm Biotech*, v. 3, p. 45-57, 2002.
- LeMAGUERES, P.; IM, H.; DVORAK, A.; STRYCH, U.; BENEDIK, M.; KRAUSE, K. L. Crystal structure at 1.45 Å resolution of alanine racemase from a pathogenic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, contains both internal and external aldimine forms. *Biochemistry*, v. 42(50), p. 14752-14761, 2003.
- LeMAGUERES, P.; IM, H.; EBALUNODE, J.; STRYCH, U.; BENEDIK, M. J.; BRIGGS, J. M.; KOHN, H.; KRAUSE, K. L. The 1.9 Å crystal structure of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* contain a conserved entryway into the active site. *Biochemistry*, v. 44(5), p. 1471-1481, 2005.
- LENZ, G. the RNA interference revolution. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 1749-1757, 2005.
- LEVIN, B. R.; BULL, J. J. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *Am Nat*, v. 147, p. 881-898, 1996.
- LEVIN, A. A. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, v. 1489(1), p. 68-84, 1999.

LI, Y.; HSIN, J.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; SHANG, W.; CASEY, HUANG, K. C.; WANG, H-W.; YE, S. FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. *Science*, v. 341(6144), doi:10.1126/science.1239248, 2013.

LIN, A.; JIMENEZ, J.; DERR, J.; VERA, P.; MANAPAT, M. L.; ESVELT, K. M.; VILLANUEVA, L.; LIU, D. R.; CHEN, I. A. Inhibition of Bacterial Conjugation by Phage M13 and Its Protein g3p: Quantitative Analysis and Model. *PLoS ONE*, v. 6(5): e19991. doi:10.1371/journal.pone.0019991, 2011.

Li, Y., Liu, Y. & Breaker, R. R. Capping DNA with DNA. *Biochemistry*, v. 39, p. 3106-3114, 2000.

LI, D.; SHLYAHOVSKY, B.; ELBAZ, J.; WILLNER, I. *J Am Chem Soc*, v. 129, p. 5804-5805, 2007.

LI, J.; WANG, N.; LUO, Q.; WAN, L. The 10-23 DNA enzyme generated by novel expression vector mediate inhibition of taco expression in macrophage. *Oligonucleotides*, v. 20(2), p. 61-68, 2010.

LI, J.; ZHENG, W.; KWON, A. H.; LU, Y. *J Am Chem Soc*, v. 122, p. 10466-10467, 2000.

LIMA, J. B. M. Efeito do Grau de Superenrolamento de Plasmídeos na sua Estabilidade Estrutural e Função Biológica. Dissertação, Mestrado em Biologia Molecular e Genética: Universidade de Lisboa, Lisboa - Portugal, p. 30, 2008.

LIMA, W. F.; PRAKASH, T. P.; MURRAY, H. M.; KINBERGER, G. A.; LI, W.; CHAPPELL, A. E.; LI, C. S.; MURRAY, S. F.; GAUS, H.; SETH, P. P.; SWAYZE, E. E.; CROOKE, S. T. Singlestranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell*, v. 150, p. 883-894, 2012.

ŁOBOCKA, M.; HENNIG, J.; WILD, J.; KŁOPOTOWSKI, T. Organization and expression of the *Escherichia coli* K-12 *dad* operon encoding the smaller subunit of D-amino acid

dehydrogenase and the catabolic alanine racemase. *Journal of Bacteriology*, v. 176(5), p. 1500-1510, 1994.

LORENZ, S. H.; JAKOB, R. P.; WEININGER, U.; BALBACH, J.; DOBBEK, H.; SCHMID, F. X. The Filamentous Phages fd and IF1 Use Different Mechanisms to Infect *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, v. (405), p. 989–1003, 2011.

LORSCH, J. R. & SZOSTAK, J. W. *In vitro* evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature*, v. 371, p. 31-36, 1994.

LU, Z. X.; YE, M.; YAN, G. R.; LI, Q.; TANG, M.; LEE, L. M. SUN, L. Q.; CAO, Y. Effect of EBV LMP1 targeted DNazymes on cell proliferation and apoptosis. *Cancer Gene Ther.*, v. 12, p. 647-654, 2005.

LYNCH, J. L.; NEUHAUS, F. C. On the mechanism of action of the antibiotic *O*-Carbamyl-D-Serine in *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, v. 91(1), p. 449-460, 1966.

LUBKOWSKI, J.; HENNECKE, F.; PLÜCKTHUN, A.; WLODAWER, A. The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nature Struct Biol*, v. 5, p. 140–147, 1998.

LUBKOWSKI, J.; HENNECKE, F.; PLÜCKTHUN, A.; WLODAWER, A. Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of To1A. *Structure*, v. 7(6), p. 711–722, 1999.

MAK, J.; KLEIMAN, L. Primer tRNAs for Reverse Transcription. *Journal of Virology*, v. 71(11), p. 8087-8095, 1997.

MARQUET, L. J.; ISEL, C.; EHRESMANN, C.; EHRESMANN, B. tRNAs as primer of reverse transcriptase. *Biochimie*, v. 77, p. 113-124, 1995.

MARVIN, D. A. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol*, v. 8, p. 150–158, 1998.

MATSUZAKI, S.; RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; SAKURAI, S.; UJIHARA, T.; KURODA, M.; IKEUCHI, M.; TANI, T.; FUJIEDA, M.; WAKIGUCHI, H.; IMAI, S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*, v. (11), p. 211–219, 2005.

MATZ, L. L.; BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, v. 101, p. 196-201, 1970.

MATHEW, E.; ZHI, J.; FREUNDLICH, M. Lrp is a direct repressor of the dad operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, v. 178(24), p. 7234-7240, 1996.

MAURA, D.; GALTIER, M.; LE BOUGUÉNEC, C.; DEBARBIEUX, L. Virulent bacteriophages can target O104:H4 Enterotoxigenic *Escherichia coli* in mouse intestine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 56(12), DOI: 10.1128/AAC.00602-12, 2012.

McMICKEN, H. W.; BATES, P. J.; CHEN, Y. Antiproliferative activity of G-quartet-containing oligonucleotides generated by a novel single-stranded DNA expression system. *Cancer Gene Therapy*, v. 10, p. 867-869, 2003.

MENDOZA-VARGAS A.; OLVERA L.; OLVERA M.; GRANDE, R.; VEJA-ALVARADO, L.; TABOADA, B.; JIMENEZ-JACINTO, V.; SALGADO, H.; JUÁREZ, K.; CONTRERAS-MOREIRA, B.; HUERTA, A. M.; COLLADO-VIDES, J.; MORETT, E. Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS ONE*, v. 4(10): e7526 DOI: 10.1371/journal.pone.0007526, 2009.

MERRIL, C.R.; BISWAS, B.; CARLTON, R.; JENSEN, N.C.; CREED, G.J.; ZULLO, S.; ADHYA, S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci*, v. 93, p. 3188-3192, 1996.

MERRIL C. R.; SCHOLL D.; ADHYA S. 2006. Phage therapy, p. 725–741 *In* Calendar R., editor. (ed.), *Bacteriophages*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, NY.

MESNARD, J-M.; LEBEURIER, G. How do viral reverse transcriptases recognize their RNA genome? *FEBS*, v. 287(1,2), p. 1-4, 1991.

NEUHAUS, F. C.; HAMMES, W. P. Inhibition of cell wall biosynthesis by analogs of alanine. *Pharmacol. Ther.*, v. 14, p. 265-319, 1981.

MIN, C-K.; YANG, J-S.; KIM, S.; CHOI, M-S.; KIM, I-S.; CHO, N-H. Genome-based construction of the metabolic pathways of *Orientia tsutsugamushi* and Comparative analysis within the Rickettsiales Order. *Comparative and Functional Genomics*, v. 2008, p. 1-14, 2008.

MIROCHNITCHENKO, O.; INOUE, S.; INOUE, M. Production of single-stranded DNA in mammalian cells by means of a bacterial retron. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 2380-2383, 1994.

MOROLLO, A. A.; PETSKO, G. A.; RINGE, D. Structure of a Michaelis complex analogue: propionate binds in the substrate carboxylate site of alanine racemase. *Biochemistry*, v. 38, p. 3293-3301, 1999.

NEIDHART, D. J.; DISTEFANO, M. D.; TANIZAWA, K.; SODA, K.; WALSH, C. T.; PETSKO, G. A. X-ray crystallographic studies of the alanine-specific racemase from *Bacillus stearothermophilus*. Overproduction, crystallization, and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 15323-15326, 1987.

NOE, C. R.; WINKLER, J.; URBAN, E.; GILBERT, M.; HABERHAUER, G.; BRUNAR, H. Zwitterionic Oligonucleotides: A Study on Binding Properties of 2'-O-Aminoethyl Modifications. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, v. 24(8), p. 1167-1185, 2005.

NOMURA, T.; YAMAMOTO, I.; MORISHITA, F.; FURUKAWA, Y.; MATSUSHIMA, O. Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*. *J. Exp. Zool.*, v. 289, p. 1-9, 2001.

NUNGESTER, W.J.; WATROUS, R.M. Accumulation of bacteriophage in spleen and liver following its intravenous inoculation. *Proc Soc Exper Biol Med*, v. 31, p. 901-905, 1934.

OCHS, H. D.; DAVIS, S. D.; WEDGWOOD, R. J. Immunologic responses to bacteriophage øX 174 in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest*, v. 50, p. 2559-2568, 1971.

OCHS, H. D.; NONOYAMA, S.; ZHU, Q.; FARRINGTON, M.; WEDGWOOD, R. J. Regulation of antibody responses: the role of complement and adhesion molecules. *Clin Immunol Immunopathol*, v. 67 (3), p. S33-S40, 1993.

OEHLER, S.; AMOUYAL, M.; KOLKHOF, P.; WILCKEN-BERGMANN, B.; MÜLLER-HILL, B. Quality and position of the three lac operators of *E. coli* define efficiency of repression. *EMBO J.*, v. 13(14), p. 3348–3355, 1994.

OEHLER S.; EISMANN, E. R.; KRÄMER, H.; MÜLLER-HILL, B. The three operators of the lac operon cooperate in repression. *EMBO J.*, v. 9(4), p. 973-979, 1990.

OH, Y-K.; PARK, T. G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery. Reviews*, v. 61, p. 850–862, 2009.

PAIARDINI, A.; CONTESTABILE, R. ; D'AGUANNO, S. ; PASCARELLA, S. ; BOSSA, F. Threonine aldolase and alanine racemase : novel examples of convergent evolution in the superfamily of vitamin B6-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1647, p. 214-219, 2003.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 849–858, 2010.

PANET, A.; BERLINER, H. Binding of tRNA to reverse transcriptase of RNA tumor viruses. *J. Virol.*, v. 26, p. 214-220, 1978.

PARANCHYCH, W.; FROST, L. S. The physiology and biochemistry of pili. *Advan. Microbiol Physiol*, v. 29, p. 53–114, 1988.

PATERSON B.M., ROBERTS B.E., KUFF E.L. Structural gene identification and mapping by DNA–mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.74, p.4370–4374, 1977.

PAYNE, R. J. H.; JANSEN, V. A. A. Understanding bacteriophage therapy in a density-dependent kinetic process. *J Theor Biol*, v. 208, p. 37-48, 2001.

PÉREZ-RUIZ, M.; BARROSO-delJESUS, A.; BERZAL-HERRANZ, A. Specificity of the hairpin ribozyme: sequence requirements surrounding the cleavage site. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274(41), p. 29376-29380, 1999.

PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl Environ Microbiol*, v. 50, p. 1496-1501, 1985.

POUILLOT, F.; CHOMTON, M.; BLOIS, H.; COURROUX, C.; NOELIG, J.; BIDET, P.; BINGEN, E.; BONACORSI, S. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by O25b:H4-ST131 *E. coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob. Agents Chemother.*, DOI:10.1128/aac.06330-11, 2012.

PRESTON, R. A.; DOUTHIT, H. A. Germination of *Bacillus cereus* spores: critical control by DL-alanine racemase. *J. Gen. Microbiol.*, v. 130, p. 3123-3133, 1984, 1984.

PRESTON, R. A.; DOUTHIT, H. A. Functional relationships between L- and D-alanine, inosine and NH₄Cl during germination of spores of *Bacillus cereus* T. *J. Gen. Microbiol.*, v. 134, p. 3001-3010, 1988.

PRIYADARSHI, A.; LEE, E. H.; SUNG, M. W.; NAM, K. H.; LEE, W. H.; KIM, E. E.; HWANG, K. Y. Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1794, p. 1030-1040, 2009.

RAGKOUSI, K.; EICHENBERGER, P.; van OOIJ, C.; SETLOW, P. identification of a new gene essential for germination of *Bacillus subtilis* spores with Ca²⁺-dipicolinate. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 2315-2329, 2003.

RAKONJAC, J.; BENNETT, N. J.; SPAGNUOLO, J.; GAGIC, D.; RUSSEL, M. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 13, p. 51-76, 2011.

RASMUSSEN, L. C. V.; SPERLING -PETERSEN, H. U.; MORTENSEN, K. K. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence -specific inhibition. *Microbial Cell Factories*. v. 6(24), p. 1-26, 2007.

RIECHMANN, L.; HOLLIGER, P. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell*, v. 90, p. 351–360, 1997.

ROCKWELL, P.; O'CONNOR, W. J.; KING, K.; GOLDSTEIN, N. I.; ZHANG, L. M.; STEIN, C. A. Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 6523-6528, 1997.

ROTH, J. M.; TANESE, N.; GOFF, S. P. Purification and Characterization of Murine Retroviral Reverse Transcriptase Expressed in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260(16), p. 9326-9335, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SANGER, F.; COULSON, A. R.; BARRELL, B. G.; SMITH, A. J.; ROE, B. A. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol*, v. 143(2), p. 161-178, 1980.

SANTIAGO, F. S.; LOWE, H. C.; KAYURMA, M. M.; CHESTER-MAN, C. N.; BAKER, A.; ATKINS, D. G.; KHACHIGIAN, L. M. New DNA enzyme targeting Erg-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nat. Med.*, v. 5, p. 1264-1269, 1999.

SANTORO, S. W. & JOYCE, G. F. A general purpose RNA -Cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 4262-4266, 1997.

SCHEFFERS, D. J.; PINHO, M. G. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol*, v.69, p. 585-607, 2005.

SCHEIRING, J.; ANDREOLI, S. P.; ZIMMERHACKL, L. B. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*, v. 23, p. 1749–1760, 2008.

SCHUBBERT, R.; RENZ, D.; SCHMITZ, B.; DOERFLER, W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 961–966, 1997.

SCHUBERT, S.; CUENCA, S.; FISCHER, D.; HEESEMANN, J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J Infect Dis*, v. 182, p. 1268–1271, 2000.

SCHUBERT, S.; DARLU, P.; CLERMONT, O.; WIESER, A.; MAGISTRO, G.; HOFFMANN, C.; WEINERT, K.; TENAILLON, O.; MATIC, I.; DENAMUR, E. Role of Intraspecies Recombination in the Spread of Pathogenicity Islands within the *Escherichia coli* Species. *PLoS Pathog*, v. 5(1): e1000257. doi:10.1371/journal.ppat.1000257, 2009.

SCHUBERT, S.; PICARD, B.; GOURIOU, S.; HEESEMANN, J.; DENAMUR, E. *Yersinia* highpathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun*, v. 70, p. 5335–5337, 2002.

SCHUBBERT, R.; HOHLWEG, U.; RENZ, D.; DOERFLER, W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet*, v. 259, p. 569-576, 1998.

SCHUBBERT, R.; HOHLWEG, U.; RENZ, D.; DOERFLER, W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet*, v. 259, p. 569–576, 1998.

SETLOW, B.; COWAN, A. E.; SETLOW, P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 637-348, 2003.

SHAW, J. P.; PETSKO, G. A.; RINGE, D. Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, v. 36, p. 1329-1342, 1997.

SHIBATA, K.; SHIRASUNA, K.; MOTEGI, K.; KERA, Y.; ABE, H.; YAMADA, R. Purification and properties of alanine racemase from crayfish *Procambarus clarkia*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v. 126, p. 599-608, 2000.

SKOBLOV, M. Y. Prospects of Antisense Therapy Technologies. *Molecular Biology*, v. 43(6), p. 917-929, 2009.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Successful treatment of experimental *E. coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol*, v. 128, p. 307-318, 1982.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B.; SHAW, K. M. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol.*, v. 133, p. 1111-1126, 1987.

SOKOLOFF, A. V.; BOCK, I.; ZHANG, G.; SEBESTYEN, M.G.; WOLFF, J. A. The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display. *Mol Ther*, v. 2, p. 131-139, 2000.

STRICKER, J.; ERICKSON, H. P. In vivo characterization of *Escherichia coli ftsZ* mutants: Effects on Z-ring structure and function. *J. Bacteriol.*, v. 185(16), p. 4796-4805, 2003.

STRYCH, U.; BENEDIK, M. J. Mutant analysis shows that alanine racemases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are dimeric. *Journal of Bacteriology*, v.184(15), p. 4321-4325, 2002.

STRYCH, U.; BENEDIK, M. Mutant analysis shows that alanine racemases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are dimeric. *Journal of Bacteriology*, v. 184(15), p. 4321-4325, 2002.

STRYCH, U.; DAVLIEVA, M.; LONGTIN, J. P.; MURPHY, E. L.; IM, H.; BENEDIK, M. J.; KRAUSE, K. L. Purification and preliminary crystallization of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiology*, v. 7(40), p. 1-7, 2007.

STRYCH, U.; HUANG, H. C.; KRAUSE, K. L.; BENEDIK, M. J. Characterization of the alanine racemases from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr. Microbiol.*, v. 41, p. 290-294, 2000.

STRYCH, U.; PENLAUD, R. I.; JIMENEZ, M.; KRAUSE, K. L.; BENEDIK, M. J. Characterization of alanine racemases from two mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 196, p. 93-98, 2001.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS JR, J. G. Bacteriophage therapy, *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 45, p. 649-659, 2001.

SUN, L.-Q.; CAIRNS, M. J.; GERLACH, W. L.; WITHERINGTON, C.; WANG, L.; KING, A. Suppression of smooth muscle cell proliferation by a *c-myc* RNA-cleaving deoxyribozyme. *J Biol Chem*, v. 274(24), p. 17236-17241, 1999.

TAN, X.-X. et al. DNA Enzyme Generated by a Novel Single -Stranded DNA Expression Vector Inhibits Expression of the Essential Bacterial Cell Division Gene *ftsZ*. *Biochemistry*, v. 43(4), p. 1111-1117, 2004.

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. DNAzyme delivery system: getting past first base. *Expert Opin. Drug Deliv.*, V. 6, p. 127-138, 2009.

TANAKA, N.; SASHIKATA, K.; WADA, T.; SUGAWARA, S.; UMEZAWA, H. Mechanism of action of *O*-carbamyl-D-serine. *J. Antibiotics (Tokyo) Ser. A*, v. 16, p. 217-221, 1963.

TANIZAWA, K.; OSHIMA, A.; SCHEIDGGER, A.; INAGAKI, K.; TANAKA, H.; SODA, K. Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: DNA and protein sequence determination and secondary structure prediction. *Biochemistry*, v. 27, p. 1311-1316, 1988.

TEDESCHI, L.; LANDE, C.; CECCHETTINI, A.; CITTI, L. Hammerhead ribozymes in therapeutic target discovery and validation. *Drug Discovery Today*, v. 14 (15/16), doi:10.1016/j.drudis.2009.05.003, 2009.

THOMPSON, A. J. V.; PATEL, K. Antisense Inhibitors, Ribozymes, and siRNAs. *Clin Liver Dis*, v. 13, p. 375-390, 2009.

THORNBERRY, N. A. et al. Mechanism-based inactivation of alanine racemase by 3-halovinylglycines. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266(32), p. 21657-21665, 1991.

THORNBERRY, N. A.; BULL, H. G.; TAUB, D.; GREENLEE, W. J.; PATCHETT, A. A.; CORDES, E. H. Halovinylglycines. Efficient irreversible inhibitors of *E. coli* alanine racemase. *J. Am. Chem. Soc.*, v.109, p. 7543-7544, 1987.

TODD, S. J.; MOIR, A. J.; JOHNSON, M. J.; MOIR, A. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 3373-3378, 2003.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8 (5), p. 508-513, 2002.

TWORT, F. W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, v. 186 (4814), p. 1241-1243, 1915.

UHLMANN, E. Oligonucleotide technologies: synthesis, production, regulations and application. *Exp Opin Biol Ther*, v. 1, p. 319-328, 2001.

UO, T.; YOSHIMURA, T.; TANAKA, N.; TAKEGAWA, K.; ESAKI, N. Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eukaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *Journal of Bacteriology*, v. 183(7), p. 2226-2233, 2001.

VAISH, N. K.; KORE, A. R.; ECKSTEIN, F. Recent developments in the hammerhead ribozyme field. *Nucleic Acids Res*, v. 26, p.5237-5242, 1998.

VESTER, B.; LUNDBERG, L. B.; SORENSEN, M. D.; BABU, B. R.; DOUTHWAITE, S.; WENGEL, J. LNAzymes: incorporation of LNA-type monomers into DNAzymes markedly increases RNA cleavage. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 124, p. 13682-13683, 2002.

VOLLMER, J.; JEPSEN, J. S.; UHLMANN, E.; SCHETTER, C.; JURK, M.; WADER, T.; WULLNER, M.; KRIEG, A. M. Modulation of CpG oligodeoxynucleotide-mediated immune stimulation by locked nucleic acid (LNA). *Oligonucleotides*, v. 14(1), p. 23-31, 2004.

WAHLESTEDT, C.; SALMI, P.; GOOD, L.; KELA, J.; JOHNSON, T.; HÖKFELT, T.; BROBERGER, C.; PORRECA, F.; LAI, J.; REN, K.; OSSIPOV, M.; KOSHKIN, A.; JAKOBSEN, N.; SKOUV, J.; OERUM, H.; JACOBSEN, M. H.; WENGEL, S. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 97, p. 5633-5638, 2000.

WAKAMATSU, T.; KITAMURA, Y.; KOTERA, Y.; NAKAGAWA, N.; KURAMITSU, S.; MASUI, R. Structure of RecJ exonuclease defines its specificity for single-stranded DNA. *The Journal Of Biological Chemistry*, vol. 285(13), p. 9762–9769, 2010.

WALSH, C. T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264(5), p. 2393-2396, 1989.

WALTON, S. P.; ROTH, C. M.; YARMUSH, M. L. Antisense Technology, In: *The Biomedical Engineering Handbook*. 2nd Ed. Vol. II, Chap 103, 1999, CRC Press LLC: Boca Raton, FL.

WANG, E.; WALSH, C. Suicide substrates for the alanine racemase of *Escherichia coli* B. *Suicide Substrates for Alanine Racemase*, v. 17(7), p. 1313-1321, 1978.

WAN, Z.; GODDARD, N. L. Competition between conjugation and M13 phage infection in *Escherichia coli* in the absence of selection pressure: a kinetic study. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 2, p. 1137-1144, 2012.

WASSERMAN, S.; DAUB, E.; GRISAFI, P.; BOTSTEIN, D.; WALSH, C. T. Catabolic Alanine Racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA sequence, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry*, v. 23, p. 5182-5187, 1984.

WASSERMAN, S. A.; WALSH, C. T.; BOTSTEIN, D. Two alanine racemase genes in *Salmonella typhimurium* that differ in structure and function. *J. Bacteriol.*, v. 153, p. 1439-1450, 1983.

WATANABE, A.; KUROKAWA, Y.; YOSHIMURA, T.; KURIHARA, T.; SODA, K.; ESAKI, N. Role of lysine 39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate. Chemical rescue studies of Lys39→Ala mutant. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p.4189-4194, 1999a.

WATANABE, A. YOSHIMURA, T.; MIKAMI, B.; ESAKI, N. Tyrosine 265 of alanine racemase serves as a base abstracting α -hydrogen from L-alanine: the counterpart residue to lysine 39 specific to D-alanine. *J. Biochem.*, v. 126, p.781-786, 1999b.

WATANABE, A.; YOSHIMURA, T.; MIKAMI, B.; HAYASHI, H.; KAGAMIYAMA, H.; ESAKI, N. Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: X-ray crystallographic studies of the enzyme bound with *N*-(5'-phosphopyridoxyl) alanine. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 19166-19172, 2002.

WEBSTER, R. E. Filamentous phage biology. In: *Phage Display - A Laboratory Manual* (Barbas, C. F. III, Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J., eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, p. 127-181, 2004.

WICKNER, W. et al. RNA synthesis initiates *in vitro* conversion of M13 DNA to its replicative form. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 69(4), p. 965-969, 1972.

WILD, J.; HENNIG, J.; ŁOBOCKA, M.; WALCZAK, W.; KŁOPOTOWSKI, T. Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, v. 198, p.315-322, 1985.

WOOD, W. A. The discovery, synthesis, and role of pyridoxal phosphate: phase I of many phases in the Gunsalus odyssey. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 312, p. 185-189, 2003.

WOOD, W. A.; GUNSALUS, I. C. D-alanine formation: a racemase in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.*, v. 190, p. 403-415, 1951.

WU W.; HENDERSON, L. E.; COPELAND, T. D.; GORELICK, R. J.; BOSCHE, W. J.; REIN, A.; LEVIN, J. G. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polypurine tract. *J Virol*, v. 70(10), p. 7132-7142, 1996.

WU, Y.; YU, L.; McMAHON, R.; ROSSI, J. J.; FORMAN, S. J.; SNYDER, D. S. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozyme (DNAzyme). *Hum Gene Ther*, v. 10(17), p. 2847-2857, 1999.

YAN, X.; GAI, Y.; LIANG, L.; LIU, G.; TAN, H. A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*, v. 187, p. 371-378, 2007.

YOKOIGAWA, K.; HIRASAWA, R.; UENO, H.; OKUBO, Y.; UMESAKO, S.; SODA, K. Gene cloning and characterization of alanine racemases from *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 288, p. 676-684, 2001.

YOSHIMURA, T. & ESAKI, N. Amino acid racemases: functions and mechanisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96(2), p. 103-109, 2003.

YOSHIMURA, T. & GOTO, M. D-aminoacids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *FEBS Journal*, v. 275, p. 35-27-3537, 2008.

ZAMECNIK, P. C.; STEPHENSON, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 75, p.

280–284, 1978.

ZHANG, B. & CECH, T. R. Peptide bond formation by *in vitro* selected ribozymes. *Nature*, v. 390, p. 96-100, 1997.

ZHI, J.; MATHEW, E.; FREUNDLICH, M. Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Mol Microbiol*, v. 32(1), p. 29-40, 1999.

ZOJA, C.; BUELLI, S.; MORIGI, M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol*, v. 25, p. 25:2231–2240, 2010.

ZON, G. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides: introductory concepts and possible molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol. Lett.*, v. 82-83, p. 419-424, 1995.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, v. 31(13), p. 3406-3415, 2003.





ANEXOS



ANEXO 1

Protocolo: Preparo de células competentes de *E. coli*, linhagem DH5 α F'IQ, para eletroporação

Referência: Adaptado de Sambrook *et al* (1989).

- 1- Uma amostra da linhagem *E. coli* DH5 α F'IQ, mantida estocada em glicerol 40% e sob refrigeração de -80 °C, foi repicada em placa contendo o meio de cultura LB Agar contendo kanamicina 50 μ g/mL;

Nota: *E. coli* DH5 α F'IQ apresenta resistência intrínseca à kanamicina

- 2- Incubou-se a cultura a 37 °C, por aproximadamente 16h, até a obtenção de colônias isoladas;
- 3- Retirou-se, com auxílio de um palito estéril (também ponteira ou alça estéril), uma colônia isolada de bactéria e inoculou-se esta em 20 mL de meio SOB com kanamicina 50 μ g/mL. A cultura foi incubada a 37 °C, por 16h, sob agitação de 180 rpm;
- 4- Transferiu-se 0,5 mL do pré-inóculo para 200 mL de meio SOB sem antibiótico. O pré-inóculo foi ajustado de forma que o crescimento começasse com uma DO₆₀₀ = 0,1. Deixou-se crescer até atingir uma DO₆₀₀ = 0,5. Ao todo, o cultivo foi realizado para um volume de 400 mL de meio de cultura, dividido em 2 frascos contendo, cada, 200 mL da respectiva cultura. Estes frascos eram Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, para promover uma aeração razoável da cultura.

Nota: o ideal é utilizar frascos de 1L, para otimizar a aeração.

- 5- Alíquotas de 45 mL desta cultura foram centrifugadas em tubos do tipo “Falcon”, com capacidade de 50 mL, à 5.000 rpm, a 4 °C, por 10 min, por várias vezes até formar um grande *pellet* no fundo do frasco;
- 6- O *pellet* foi lavado com glicerol 10% gelado, resuspendendo-o gentilmente até que o *pellet* se dissolvesse. Centrifugou-se a 5. 5.000 rpm, por 8 min, a 4 °C. Este procedimento de lavagem foi repetido por 4 vezes.

Nota: O glicerol tem como função proteger as bactérias, pois ao envolvê-las forma uma camada protetora, evitando que a camada celular das mesmas se

rompa durante o processo de congelamento e descongelamento da célula competente;

- 7- O *pellet* foi ressuspenso em igual volume de glicerol 10%. O volume final ficou em torno de 1,5 a 2 mL.

Nota: Quanto menor o volume utilizado melhor, pois as células ficam mais concentradas;

- 8- Alíquotas de 100 µL de células eletrocompetentes foram distribuídas em microtubos estéreis do tipo Eppendor e então levadas rapidamente ao freezer -80 °C, para serem preservadas até o momento do uso.

* *

ANEXO 2

Protocolo: Transformação de células eletrocompetentes por eletroporação

Referência: Sambrook *et al* (1989).

- 1- As células competentes para eletroporação foram “desgeladas” no gelo;
- 2- Utilizou-se 1 μ L de princípio transformante, adicionando-o às células eletrocompetentes. Agitou-se gentilmente, com auxílio da ponteira. A amostra foi cuidadosamente transferida para uma cubeta de eletroporação de 2 mm.

Nota: não se deve resuspender ('up-and-down').

- 3- A eletroporação ocorreu com o aparelho ajustado para 1.900 volts. A cubeta foi deixada no gelo por algum tempo antes da eletroporação;
- 4- Em seguida, adicionou-se 1 mL de LB à cubeta, de modo a retirar as células eletroporadas com o princípio transformante, transferindo-as para um microtubo do tipo Eppendorf, com capacidade para 2 mL. Este último foi incubado por 1 h, a 37 °C, sob agitação branda de 80 rpm;
- 5- Alíquotas de 10 μ L, 25 μ L e 50 μ L foram plaqueadas em meio seletivo.

Nota: no caso de ampicilina, utilizou-se a concentração de 200 μ g/mL.

* *

ANEXO 3

Protocolo: Mini-Indução de Expressão Gênica de pRT 30-2

Referência: Adaptado de Sambrook *et al* (1989).

- 1- Repicou-se uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2 em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio de cultura LB líquido com glicose (1%) e ampicilina (100 μ g/mL). Essa cultura foi incubada a 37°C, por 16 horas, e sob agitação (180 rpm);
- 2- Alíquotas de 100 μ L foram retiradas desse pré-inóculo e adicionadas, respectivamente, em quatro tubos de ensaios contendo 2 mL de meio LB líquido, contendo ampicilina 100 μ g/mL, em condições distintas:
 - **Tubo de ensaio 1:** Ausência de glicose / Ausência IPTG
 - **Tubo de ensaio 2:** Presença de glicose (1%) / Ausência IPTG;
 - **Tubo de ensaio 3:** Presença de glicose (1%) / Presença de IPTG* (1mM)
 - **Tubo de ensaio 4:** Ausência de glicose / Presença de IPTG* (1mM)

Obs: Um tubo contendo somente meio LB foi usado como controle
- 3- Todas as amostras foram incubadas a 37°C, e sob agitação de 160 rpm, até obter-se uma DO₆₀₀ = 0,6 (\pm 1h de tempo transcorrido). Neste momento, adicionou-se somente ao tubo 3 e 4 mais 2 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 μ g/mL e IPTG 4 mM, de modo que a concentração final deste último ficasse em 1mM (*). Aos tubos 1 e 2, adicionar somente mais 1 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 μ g/mL;
- 4- As células foram incubadas novamente por mais 1 ou 2 horas nas mesmas condições descrita anteriormente, para induzir a síntese da proteína recombinante;
- 5- Coletou-se um volume de 1,5 mL de cada tubo de ensaio e transferiu-se para microtubos do tipo Eppendorf, com capacidade de 2 mL. A amostra foi centrifugada por 5 min, a 10.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4°C;
- 6- Descartou-se o sobrenadante e o sedimento celular foi ressuspenso em 50 μ L de “tampão de amostra” para SDS-PAGE;

- 7- Em seguida, as amostras foram agitadas em “vortex” por aproximadamente 5 min, para “quebrar” o DNA;
- 8- Para que as amostras pudessem ser analisadas em gel SDS-PAGE, elas foram previamente fervidas em “banho de água”, por cerca de 5 min e; em seguida, centrifugadas rapidamente. Após isto, uma alíquota de 5-10 μL de cada amostra foi aplicada ao gel.

* *

ANEXO 4

Protocolo: Preparo de células competentes de *E. coli*, linhagem DH5 α F'IQ, para transformação por choque térmico (método do cloreto de cálcio)

Referência: Sambrook *et al* (1989).

- 1- Uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α F'IQ foi semeada por estriamento em meio LB ágar contendo 50 μ g/mL de kanamicina e incubada a 37 °C, durante 16h, até a obtenção de colônias isoladas;

Nota: A linhagem E. coli DH5 α F'IQ apresenta resistência intrínseca à kanamicina.

- 2- Uma colônia isolada da bactéria foi retirada e inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo 50 μ g/mL de kanamicina e incubada a 37 °C, sob agitação de 180 rpm, durante 16h;
- 3- Transferiu-se 0,5 mL dessa cultura para 50 mL de meio LB líquido sem antibiótico. A cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação de 180 rpm, até atingir uma DO₆₀₀= 0,3-0,4;
- 4- Após este período, as células foram coletadas em tubo estéril do tipo “Falcon” por centrifugação a 2.500 g, durante 15 min, a °C;

Nota: A partir desta etapa, as células foram mantidas entre 0 e 4 °C e não foram submetidas a traumas mecânicos ou forte agitação.

- 5- Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 10 mL de solução Tris-Cálcio, em seguida, a amostra foi centrifugada a 2.000 g, durante 15 min, a 4 °C;
- 6- Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se delicadamente as células em 1 mL de solução Tris-Cálcio. Esta amostra foi deixada no gelo por aproximadamente 45 min e após este período as células foram consideradas competentes para transformação por choque térmico;
- 7- Aliquotas de 50 μ L de células competentes foram distribuídas em microtubos do tipo Eppendorf estéreis.

Nota: Pode ser aliquotado 100 μ L também.

* *

ANEXO 5

Protocolo: Transformação de células competentes por choque térmico (método do cloreto de cálcio)

Referência: Adaptado de Sambrook *et al* (1989).

- 1- 1 a 500 ng do princípio transformante foi adicionado à 50 µL de células competentes, contida em um microtubo do tipo Eppendorf;
- 2- O sistema de transformação foi incubado em gelo por aproximadamente 60 min;
Nota: o tempo de incubação em gelo é de 30 a 60 min.
- 3- Submeteu-se o sistema de transformação a um choque térmico de 37 °C, por 5 min;
Nota: o choque térmico também pode ocorrer a 42 °C, por 2 min.
- 4- Após o choque térmico, acrescentou-se gentilmente 1 mL de meio LB líquido ao sistema de transformação e este foi incubado à 37 °C, por 1 h;
- 5- Para a seleção dos transformantes, alíquotas de 10 µL, 25 µL e 50 µL foram plaqueadas (com auxílio da alça de Drigalski) em meio LB ágar contendo 200 µg/mL de ampicilina.
- 6- O meio foi incubado a 37 °C, por 16h.

* *

ANEXO 6

Protocolo: Análise da produção da DNazima *ftsZ* pelo vetor pRT 30-2/Dz-*ftsZ*

Referência: O autor

- 1- Uma colônia bacteriana isolada de *E. coli* DH5 α F'IQ sem vetor, outra de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2 e outra de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2/Dz-*ftsZ* foram inoculadas, respectivamente, em 2 mL de meio LB líquido contendo glicose (1%) e ampicilina (100 μ g/mL) e incubada, a 37°C, por 16 horas, sob agitação (180 rpm);
- 2- Após este período, 2 alíquotas de 50 μ L do pré-inóculo de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2 e de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2/Dz-*ftsZ* foram adicionadas, respectivamente, em 2 tubos de ensaios contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 μ g/mL, e na seguintes condições:
 - Tubo de ensaio 1: Presença de glicose (1%)/Ausência IPTG;
 - Tubo de ensaio 2: Ausência de glicose/Presença de IPTG (1mM)
- 3- Uma alíquota de 50 μ L do pré-inóculo de *E. coli* DH5 α F'IQ sem vetor foi adicionada em 1 tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido, sem antibiótico;
- 4- Todas as amostras foram incubadas a 37°C, sob agitação de 180 rpm, por um período de 16 h.
- 5- Após este período, um volume de 3 mL de cada amostra foi centrifugada em microtubos do tipo Eppendorf (1,5 mL+ 1,5 mL) em 5.000 rpm, por 8 min. Descartou-se o sobrenadante e as células foram re-suspensas em 10 volumes de Trizol® (células + Trizol® = 1:10, respectivamente).
- 6- Homogenizou-se o *pellet* bacteriano com 10 volumes de trizol®;

Nota: a amostra não deve exceder 10% do volume de trizol® usado.
- 7- O homogenado foi incubado por 5 min à temperatura ambiente
- 8- Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente, em *vórtex*, por 15 a 30 seg;
- 9- Incubou-se por 5 à temperatura ambiente;
- 10- Centrifugou-se em 12.000 g, por 20 min, à temperatura ambiente;
- 11- A fase aquosa foi transferida para outro microtubo do tipo Eppendorf;

- 12- Adicionou-se 0,5 mL de isopropanol e incubou-se por 30 min;
- 13- Centrifugou-se por 12.000 g, por 20 min, à temperatura ambiente;
- 14- Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* em capela de fluxo laminar;
- 15- Adicionou-se 20 μ L de H₂O deionizada estéril, homogenizando gentilmente com auxílio de uma pipeta (*up and down*);
Nota: pode-se também adicionar 20 μ L de H₂O deionizada estéril contendo SDS 0,1% .
- 16- Adicionou-se 4 μ L de RNase A e incubou-se por 40 min. Após isto, a amostra está pronta para ser analisada por eletroforese em gel (de agarose ou acrilamida) para a constatação, ou não, de ssDNA;
- 17- Adicionou-se à amostra 5 μ L de tampão de carregamento (Loading) e, então, 10 μ L desta foi analisada por eletroforese em gel.

* *

ANEXO 7

Protocolo: Curva de crescimento envolvendo linhagens de *E. coli* DH5 α F'IQ transformadas com pRT 30-2 e pDESCP

Referência: o autor

1. Preparação do pré-inóculo:

1.1 Uma colônia bacteriana isolada da linhagem *E. coli* DH5 α F'IQ (sem vetor) foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 μ g/mL;

1.2 Uma colônia bacteriana isolada da linhagem *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pRT 30-2 foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 μ g/mL;

1.3 Uma colônia bacteriana isolada da linhagem *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pDESCP foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo glicose 1% e ampicilina 100 μ g/mL;

2. Incubou-se ambas as culturas a 37°C, por 16 horas, e sob agitação 180 rpm;

3. Inoculação para a curva de crescimento:

3.1 Uma alíquota de 500 μ L de *E. coli* DH5 α F'IQ (sem vetor) foi adicionada à 50 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL;

3.2 Duas alíquotas de 500 μ L de *E. coli* DH5 α F'IQ, transformada com pRT 30-2, foram utilizadas para inocular, respectivamente, 50 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e glicose 1% e a 50 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e IPTG 1mM;

3.3 Três alíquotas de 500 μ L de *E. coli* DH5 α F'IQ, transformada com pDESCP, foram utilizadas para inocular, respectivamente, 50 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e glicose 1%, 50 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e IPTG 0,1mM e 50 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e IPTG 1mM;

* *

ANEXO 8

Protocolo: Preparação do fago auxiliar

Referência: Adaptado de Rader *et al* (2000).

1- Obtenção das placas de lise:

1.1 Inoculou-se 2 mL de meio SB contendo kanamicina a uma concentração final de 50 µg/mL com 2µL de *E. coli* DH5αF'IQ eletrocompetente;

Nota: A linhagem de E. coli DH5αF'IQ apresenta resistência intrínseca à kanamicina.

1.2 Incubou-se a 37 °C, por aproximadamente 1h, em 250 rpm, até atingir uma DO_{600nm} = 0,6 a 1,0;

1.3 50 µL das células eram aliqüotadas em microtubos e adicionou-se 1 µL de fagos auxiliares diluídos (10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸). A amostra foi incubada por 15 minutos, a temperatura ambiente;

1.4 Adicionou-se os 50µL de células a 3 mL de meio LB top ágar liquefeito (45-50°C), misturando em seguida o tubo por inversão e, posteriormente espalhando-o em placas contendo meio LB ágar;

1.5 As placas foram incubadas a 37°C durante 16h. Após a incubação foi possível observar a formação de placas de lise (na realidade retardo de crescimento);

2- Amplificação de placas de lise:

2.1 Inoculou-se 10 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, contendo kanamicina a uma concentração final de 50 µg/mL, com 10 µL de *E. coli* DH5αF'IQ eletrocompetente. em um tubo tipo Falcon, com capacidade para 50 mL;

2.2 Incubou-se a 37 °C, por 1h, sob agitação de 180 rpm;

2.3 Com auxílio de um palito estéril, transferiu-se uma placa de lise obtida no procedimento anterior para a cultura;

2.4 A cultura foi incubada a 37 °C, por 2 horas, sob agitação de 250 rpm;

2.5 A cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 L contendo 250 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C e kanamicina a uma concentração final de 75 µg/mL;

2.6 A cultura foi incubada a 37 °C, por 16 h, sob agitação de 180 rpm;

2.7 A cultura foi centrifugada a 4.000 rpm, por 30 min, e o sobrenadante era transferido para novos tubos tipo Falcon estéreis estéreis. Procedia-se à incubação a 70°C, por 20 minutos, com o objetivo de eliminar células ainda presentes na cultura;

2.8 A amostra contendo os fagos eram estocados a 4 °C.

3- Determinação do título da preparação de fagos auxiliares:

3.1 Inoculou-se 2 mL de meio SB, contendo kanamicina a uma concentração final de 50 µg/mL com 2 µL de *E. coli* DH5αF'IQ eletrocompetente, Incubando-se a 37°C, por cerca de 1 hora, sob agitação de 250 rpm, até atingir uma DO600 ηm= 0,6 a 1,0;

3.2 50 µL das células foram aliqüotadas em microtubos do tipo Eppendorf e, então, foram adicionados 1 µL de fago auxiliar diluído (10-6, 10-7 e 10-8), em seguida incubando-se por 15 minutos, a temperatura ambiente;

3.3 Adicionavam-se os 50µL de células infectadas com o fago auxiliar a 3 mL de meio LB top agar, misturando em seguida o tubo por inversão e, posteriormente, espalhando em placas contendo o meio LB Agar;

3.4 As placas foram incubadas a 37°C, por 16h. Após a incubação, contaram-se as placas de lise obtidas para cada diluição. O título de fagos era expresso em unidades formadoras de placa (UFP)/ mL de fagos.

* *

ANEXO 9

Protocolo: Produção de partículas virais de M13 contendo o fagomídeo pDESCP

Referência: Adaptado de Rader *et al* (2000).

- 1- Uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α F'IQ transformada com pDESCP foi inoculada em 5 mL de meio SB contendo ampicilina a uma concentração final de 100 μ g/mL;
- 2- Incubou-se por a 37 °C, por 16h, em 180 rpm;
- 3- Uma alíquota de 500 μ L do pré-inóculo foi transferido para um frasco com capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio SB com ampicilina 100 μ g/mL;
- 4- A cultura foi incubada a 37 °C, por um período entre 6 e 8h, em 180 rpm, até atingir uma $DO_{600 \text{ nm}} = 1,0$;
- 5- Em seguida, adicionou-se 1 mL de fago auxiliar VCSM13 (10^{11} pfu/mL);
- 6- A cultura foi, então, incubada por mais 10 h e, em seguida, submetida a uma centrifugação de 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C;
- 7- Ao sobrenadante coletado eram adicionados 4% (p/v) de PEG 8.000 (polietilenoglicol com massa molecular em torno de 8.0000) e 3% (p/v), de cloreto de sódio. A fase sólida formada era dissolvida por agitação a 250 rpm, por 5 minutos, a 37°C. Em seguida o sobrenadante era incubado em banho de água-gelo por 30 minutos;
- 8- Os fagos eram coletados por centrifugação a 4.000 rpm, por 1 h, a 4°C;
- 9- O sobrenadante era descartado e a garrafa era deixada invertida sobre papel toalha por pelo menos 10 minutos para garantir a secagem do sedimento;
- 10- Após esse tempo as proximidades da boca da garrafa eram enxugadas com papel toalha e o sedimento ressuspensionado em 1 mL de TBS/BSA 1% (p/v);
- 11- A suspensão era transferida para um microtubo e centrifugada em velocidade total em microcentrífuga, por 10 minutos, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante, contendo as partículas virais com pDESCP, era transferido para um novo microtubo do tipo Eppendorf e estocado a 4°C.

* *

ANEXO 10

Protocolo: Transfecção de linhagem de *E. coli* contendo pilus sexual F com partículas virais de M13 contendo pDESCP.

Referência: Adaptado de Rader *et al* (2000).

- 1- Inoculou-se 2 mL de meio SB, contendo kanamicina a uma concentração final de 50 µg/mL com 2 µL de *E. coli* DH5αF'IQ eletrocompetente, Incubando-se a 37°C, por cerca de 1 hora, sob agitação de 250 rpm, até atingir uma $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$ a 1,0;
- 2- 50 µL das células foram aliquotadas em microtubos do tipo Eppendorf e, então, foram adicionados 1 µL da amostra de partículas virais de M13 contendo pDESCP diluídas (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-6}), incubando-se, em seguida, por 15 minutos, a temperatura ambiente;
- 3- Aliquotas de 50µL de células infectadas foram plaqueadas (com auxílio de uma alça de Drigalski) em placas contendo meio LB ágar com 200 µg/mL de ampicilina.
- 4- As placas foram incubadas a 37°C, por 16h.
- 5- Contaram-se as colônias obtidas para cada diluição, obtendo-se uma média. Neste caso, o título de entrada das partículas virais de M13 contendo pDESCP foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL de fagos.

* *

ANEXO 11

Protocolo: Transfecção de diferentes linhagens de *E. coli*, com e sem pilus sexual F, com partículas virais de M13 contendo pDESCP.

Referência: Adaptado de Rader *et al* (2000).

- 1- Uma colônia isolada das seguintes linhagens de *E. coli*: DH5 α F'IQ, JM109; DH5 α ; DH10b; BL21(DE3) e K-12 (original) foram inoculadas, independentemente, em 2 mL de meio SB, sem antibiótico, contido em um tubo de ensaio;
- 2- Incubou-se a 37°C, por cerca de 16 hora, sob agitação de 180 rpm;
- 3- Uma alíquota de 500 μ L de cada um dos pré-inóculos foi transferida, prespectivamente, para um novo tubo de ensaio contendo 5 mL de meio SB, sem antibiótico;
- 4- A cultura foi incubada a 37 °C, por cerca de 3h a 4h, em 180 rpm, até atingir uma $DO_{600nm} = 0,6$ a 1,0;
- 5- 50 μ L das células foram alíquotadas em microtubos do tipo Eppendorf e, então, foram adicionados 1 μ L da amostra de partículas virais de M13 contenso pDESCP (não diluído), incubando-se, em seguida, por 15 minutos, a temperatura ambiente;
- 3- Todo o volume de 50 μ L de células infectadas foram plaqueadas (com auxílio de uma alça de Drigalski) em placas contendo meio LB ágar com 200 μ g/mL de ampicilina.
- 4- As placas foram incubadas a 37°C, por 16h.

* *

ANEXO 12

Protocolo: Projeções da estrutura secundária do mRNA dos genes *alr* e *dadX* e seleção de seqüências alvo para DNazimas

Referência: O autor

Para a obtenção da estrutura secundária do RNA do gene *alr* e do RNA do gene *dadX*, procedeu-se da seguinte forma:

I- Selecionou-se as seqüências gênicas de:

(i) *alr* (NC_010473) (**APÊNDICE 3**):

- (i.i) a seqüência gênica da ORF de *alr* (1080 nt);
- (i.ii) seqüência gênica do possível operon monocistrônico de *alr*, que abrangeu a região de início de transcrição do promotor *alrp1* e 150 nt após o códon de parada do gene (1.423 nt);
- (i.iii) seqüência gênica do possível operon monocistrônico de *alr*, que abrangeu a região de início de transcrição do promotor *alrp2* e 150 nt após o códon de parada do gene (1.360 nt);

(ii) *dadX* (NC_010468) (**APÊNDICE 3**):

- (ii.i) a seqüência gênica da ORF de *dadX* (1.071 nt);
- (ii.ii) seqüência gênica do possível operon policistrônico de *dadX*, que abrangeu a região de início de transcrição do promotor *dadAp1* e 300 nt após o códon de parada do último gene deste transcrito (2.741 nt);
- (ii.iii) seqüência gênica do possível operon policistrônico de *dadX*, que abrangeu a região de início de transcrição do promotor *dadAp2* e 300 nt após o códon de parada do último gene deste transcrito (2.725 nt);
- (ii.iv) seqüência gênica do possível operon policistrônico de *dadX*, que abrangeu a região de início de transcrição do promotor *dadAp3* e 300 nt após o códon de parada do último gene deste transcrito (2.712 nt);

II- Todas as seqüências gênicas foram convertidas para o formato de RNA, por meio do programa CLC RNA Workbench versão 4.0.2;

III- As seqüências ribonucleotídicas tiveram sua estrutura secundária predita por meio do programa mFold, versão 4.6 (Zuker, 2003), disponível em plataforma *on line*, no site: <http://mfold.rna.albany.edu/>.

A ORF dos genes *alr* e *dadX* foram identificadas nas respectivas projeções das estruturas secundárias. Apenas na região correspondente às respectivas ORFs foi observada a ocorrência de possíveis arranjos em fita simples, a saber:

- (i) laço em grampo;
- (ii) laço interno;
- (iii) laço interno assimétrico;
- (iv) pseudo-nós; e
- (v) laço de múltiplas ramificações.

Todos os arranjos de RNA fita simples observados tiveram suas seqüências nucleotídicas comparadas para a identificação de possíveis regiões de interseção comuns (trechos de seqüências idênticas). Estas últimas foram, por fim, inspecionadas quanto à possibilidade de atuarem como alvos para DNazimas, de acordo como descrito por Santoro & Joyce (1997).

* *

ANEXO 13

Protocolo: Desenho de “DNAzimas 10-23” contra alvos no transcrito dos genes *alr* e *dadX*

Nota: “DNAzimas 10-23” com braços simétricos de 8nt de comprimento atuam sobre um substrato de RNA com 17nt de comprimento.

Referência: Santoro & Joyce (1997); Abdelgany et al (2005).

1- A partir da análise da estrutura secundária do RNA do gene, selecionou-se arranjos estruturais em fita simples:

- laço em grampo;
- laço interno;
- laço interno assimétrico;
- pseudo-nós;
- laço de múltiplas ramificações.

2- Nos arranjos em fita simples, e em sentido 5'→3', selecionou-se um encontro dinucleotídico purina:pirimidina (deu-se preferência para GU ou AU) com localização próxima à região central do segmento desse arranjo;

3- Contou-se 8nt para a esquerda da purina e 8nt para a direita da pirimidina.

Nota: deve-se dar preferência para o fato de que estes segmentos nucleotídicos ao redor do encontro purina:pirimidina estejam completamente na forma de fita simples.

4- O braço I da DNAzima foi projetado sobre os 8nts à esquerda da purina por meio de pareamento de bases do tipo Watson-Crick. A purina não faz pareamento com a molécula de DNAzima. O braço I tem, portanto, um comprimento de 8nt, complementar ao seu substrato;

5- O braço II da DNAzima, por meio também do pareamento de bases do tipo Watson-Crick, foi projetado para iniciar seu pareamento sobre a pirimidina (do encontro purina:pirimidina) com mais os 8nts restantes à direita daquela. A pirimidina obrigatoriamente deverá fazer pareamento com a molécula de DNAzima. O braço II, portanto, tem um comprimento de 9nt, complementar ao seu substrato;

4- Entre os braços II e I, na direção 5'→3', consta a seqüência que compõem o motivo catalítico da DNAzima: GGCTAGCTACAACGA;

5- A molécula de DNazima projetada, em sentido 5'→3', apresentou-se com a seguinte ordem: Braço II + motivo catalítico + Braço I.

6- As DNazimas foram encomendadas sob a condição dessalinizada.

* *

ANEXO 14

Protocolo: Extração de DNA total de *E. coli*

Referência: Adaptado de Sambrook *et al* (1989).

- 1- A linhagem *E. coli* K12 foi crescida em meio Agar MacConkey, a 37°C, por 16h;
- 2- Coletou-se uma colônia isolada e inoculou-se em 5 mL de meio LB contendo ampicilina 100µg/mL. Incubou-se a 37°C, por 16h, sob agitação de 180rpm;
- 3- Após este período, as células foram coletadas por centrifugação a 12.000g, durante 2min, em temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante, sendo as células ressuspensas em 1 mL de tampão TEN. A amostra foi novamente centrifugada sob as mesmas condições e, em seguida, descartou-se o sobrenadante;

Nota: nesta etapa, utilizou-se todo o volume de cultura, distribuídos em diferentes microtubos.

- 4- Ressuspendeu-se o sedimento em 300µ L de tampão TEN;
- 5- Em seguida, adicionou-se 50 µL de Triton X-100 10% e 30 µL de NaCl 3M. A amostra foi aquecida a 60°C por 5 min e então, resfriada em temperatura ambiente;
- 6- Adicionou-se 0,1V de SDS 10%, homogeneizando bem a amostra;
- 7- Transferiu-se o conteúdo de todos os microtubos para um único tubo (tubo de ensaio vidro ou similar);
- 8- Adicionou-se vagarosamente 0,1V de NaCl 3M e, em seguida, 2,5V de etanol 100% gelado;

Nota: esta etapa foi feita lentamente, de modo a não misturar os componentes da solução.

- 9- O DNA foi coletado com bastão de vidro, fazendo-se movimentos em círculo, de modo gentil e contínuo, o que permitiu que o DNA genômico se enrolasse no bastão.

Nota: esta etapa foi feita com bastante cuidado para não misturar os componentes da solução.

- 10- Em seguida, o bastão contendo o DNA foi introduzido e retirado rapidamente, e por várias vezes, em um microtubo contendo 1mL de etanol 70% gelado. Esta etapa foi realizada para lavar o DNA extraído com etanol 70%;

11- O bastão contendo o DNA foi secado em ar estéril, a temperatura ambiente, dentro de capela de fluxo laminar, por aproximadamente 10 min;

12- Após seco, o bastão contendo o DNA foi redissolvido em 500 µL de tampão R e estocado em “freezer” -20 °C até o momento de uso.

13- Antes de sua utilização, o DNA foi devidamente diluído.

* *

ANEXO 15

Protocolo: Reação de sequenciamento

Referência: Adaptado de Sambrook *et al* (1989).

- PARA A REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO SÃO NECESSÁRIOS:

1. Pré-Mix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Bioscience).
2. Primer *Forward* ou *Reverse* (utilizar um primer em cada reação separadamente)
3. Uso de água MiliQ autoclavada sendo o volume determinado, após a análise do DNA pela eletroforese em gel de agarose.
4. Microplaca (**Placa p/PCR 96 wells c/borda-Sorenson Cód 23080.**)
5. Adesivo selador (**selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950**)

*Preparar para 105 amostras para corrigir qualquer erro de pipetagem.

| Reação para um tubo | Volume (01tubo) | 105* | Volume / Placa105 |
|------------------------|--------------------|-------|----------------------|
| Pré - mix | 2,0 µL | X 105 | 220 µL |
| Primer (5,0 pmoles/µL) | 1,0 µL | X 105 | 105 µL |
| H ₂ O q.s.p | 3,0 µL | X 105 | 315 µL |
| DNA (100 a 200 ng) | 5,0 µL | -- | --- |

Preparar o pré-mix só na hora que for utilizar (sensível à luz)

Distribuir 5 µL de mix para cada poço da microplaca

Condições de ciclagem:

95°C 25 seg

95°C 15 seg.

50°C 20 seg. 30 ciclos

60°C 1:20 min.

04° C até o momento da retirada das amostras do termociclador

- PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO:

Para 10,0 µl da reação usa-se:

- ✓ 1,0 µL de acetato de amônia
- ✓ 27,5 µL etanol absoluto.
- ✓ OBS : acetato de amônio faz parte do kit de sequenciamento *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Bioscience

Precipitação:

1. Após a adição de 1 µL acetato de amônio e dar um spin,
2. Adicionar 27,5µL de etanol absoluto 100 % **MERCK** , selar bem, (**selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950**) e então vortexar vigorosamente por 1 minuto (FUNDAMENTAL)
3. Incubar 20 min temperatura ambiente, protegido da luz, coberto com papel laminado.
4. Centrifugar 40 min 4000 g a 4 °C.
5. Virar a placa e despejar o conteúdo (com bastante força).
6. Adicionar 120 µL de etanol 70% por poço selar bem com o mesmo selo, (**selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950**) e vortexar alguns segundos.
7. Centrifugar 10 min (na máxima velocidade de qualquer centrífuga) 4 °C.
8. Virar a placa e despejar o conteúdo, com força.
9. Centrifugar um pulso de alguns segundos com a placa invertida (não passar 700 g)

10. Deixar secar até evaporar o etanol (15 minutos)
11. Adicionar 10 μ l de loading buffer e vortexar muito bem (FUNDAMENTAL!)
12. Selar com **Selador Thermal Seal Sealing Film PCR-COD. TS-321-31-101 (não resistente a álcool)** e centrifugar um pulso de alguns segundos a placa (não passar 700)

* *

ANEXO 16

Protocolo: Ensaio cinético rápido da Clivagem de RNA por DNazimas *in vitro* (Cinética de único *turnover*)

Referências: Adaptado de Tan et al (2004) e Katrib (2007).

- Procedimentos da Reação:

- Volume da Reação: 10 μ L

1. 100 nM de substrato e 100 μ M de DNazima serão pré-equilibrados separadamente por 10min, a 37°C, em volumes iguais da solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; MgCl₂ 10 mM.

Nota: Os substratos de RNA utilizados neste ensaio foram gerados por reação de transcrição *in vitro*, pelo kit MEGAscript[®] T7 RNA Polymerase (Ambion). A concentração molar dos substratos de RNA foi devidamente calculada a partir do tamanho de cada transcrito e preparada a partir de sucessivas diluições.

2. As duas soluções (substrato + enzima) serão misturadas = Início da Reação.

OBS: O “tempo 0” constitui o momento exato da mistura/combinção da DNazima e do substrato.

3. 5% da reação será aliqotada nos tempos: 5, 10, 20, 30 e 60 min e rapidamente adicionada a esta “Stop Solution” em gelo.
4. As amostras serão aquecidas em 80°C por 5 min e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 16%.

* *

ANEXO 17

Protocolo: Análise da Eficiência de DNazimas (Após a Reação Cinética)

Referências: o autor.

- **Método 1:** Análise direta, por densitometria de bandas, dos produtos formados e do substrato remanescente.

Referências: Adaptado de Abdelgany *et al* (2005).

1- O gel desnaturante de acrilamida 4%, contendo as bandas de RNA, foi visualizado em um transiluminador, por emissão de luz UV (UVA e UVB), e fotografado por dispositivo de fotodocumentação.

2- E eficiência de clivagem dos transcritos “corados” com brometo de etídeo foram quantificados através da medição da intensidade das bandas dos produtos clivados (P1 e P2) e o substrato remanescente (S).

3- A percentagem de clivagem (%C) foi calculada usando a equação:

$$\%C = [(P1+P2) / (P1 + P2 + S)] \times 100$$

onde:

- P1 e P2 são, respectivamente, os produtos 5' e 3'
- S é o substrato

Notas:

- O protocolo descrito por Abdelgany, *et al* (2005) utiliza substrato de RNA marcados com o radioisótopo ³²P e a reação cinética de clivagem de RNA ocorre em um volume reacional de 10 µL

- Com o intuito de aumentar a quantidade de RNA para se averiguar o nível de clivagem, optou-se por aumentar este volume reacional para 100 µL (todo este volume reacional foi utilizado para análise em gel). Apesar do aumento do volume da reação, as concentrações molares dos reagentes continuaram as mesmas (houve somente aumento da massa de RNA em razão do volume).

- **Método 2:** análise do substrato remanescente por meio de duas reações de amplificação: (i) reação de Transcrição Reversa e (ii) PCR.

Rerefência: LI, J.; WANG, N.; LUO, Q.; WAN, L. The 10-23 DNA enzyme generated by novel expression vector mediate inhibition of taco expression in macrophage. *Oligonucleotides*, v. 20(2), p. 61-68, 2010.

Nota: quando analisada por este método, a reação cinética das DNzimas sobre seus respectivos substratos deverá ser interrompida por adição de 1/10 de volume de acetato e Sódio 3M.

- ✓ **Passo 1:** Reação de Transcrição Reversa (síntese da 1º fita).

- Volume reacional: 20µL

- 1- Adicionar 8,5µL de H₂O (livre de nucleases) em um microtubo com capacidade de 200µL;

- 2- Adicionar os demais reagentes, na seguinte ordem:

- 1µL da reação cinética (substrato)
- 1 µL de primer *senso* 100 pmoles
- 1 µL de primer *antissenso* 100 pmoles

- 3- Em seguida, misturar gentilmente a amostra, centrifugar rapidamente ('spin'), e incubá-la a 65°C, por 5 min. Após este período, centrifugá-la rapidamente ('spin') em centrífuga refrigerada e colocá-la em gelo;

4- Continuar a adicionar os demais reagentes, na seguinte ordem:

| | |
|--------------------------------------------------|------|
| - 4 µL do Tampão da reação 5X | 1X |
| - 0,5 µL <i>RNaseOUT</i> ® | 20U |
| - 2 µL dNTP Mix 10mM | 1mM |
| - 2 µL RevertAid™ H minus Reverse Transcriptase* | 400U |

* Fermentas

5- Misturar gentilmente os reagentes e centrifugar rapidamente ('spin');

6- Incubar a amostrar a 42°C, por 60min;

7- Terminar a reação por inativação da enzima a 70°C, por 10min.

✓ **Passo 2: PCR**

Nota: o passo 2 consiste de uma PCR convencional utilizando-se uma alíquota da reação do passo 1 como substrato.

- Volume reacional: 50µL

1- Adicionar os seguintes reagentes:

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| - 10 µl Tampão GoTaq® Flexi 5X | 1X |
| - 4 µL MgCl ₂ 25mM | 2mM |
| - 1 µL dNTPmix 10mM | 0,2mM |
| - 0,5 µL Primer <i>senso</i> | 10 pmoles |
| - 0,5 µL Primer <i>antissenso</i> | 10 pmoles |
| - 2 µL Substrato | ~ |
| - 0,3 µL GoTaq® DNA Polimerase* | 1,5 U |
| - dH ₂ O q.s.p. | 50 µL |

* Promega

2- As condições de termociclagem foram: um ciclo de 95°C por 2 min; 25 ciclos de: 95°C por 40 seg, 58°C por 40 seg, e 72°C por um 1min; um ciclo de 72°C por 5min; e 4°C ∞.

3- Analisar uma alíquota de 20 µL da PCR por eletroforese em gel de agarose 1,0%, contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL. A eletroforese ocorreu sob condição de 3,5V/cm, por aproximadamente 1,5 hora. O gel foi visualizado em um transiluminador, por emissão de luz UV (UVA e UVB), e fotografado por dispositivo de fotodocumentação.

* *

ANEXO 18

Protocolo: Gel Desnaturante de Acrilamida 4%

Referências: Sambrook *et al* (1989).

Para um gel de 50 mL

1- Misturar na ordem os seguintes reagentes:

| | |
|---------------------------------------------------|--------|
| - Uréia (MW 60,06) | 24,03g |
| - TEB 10X | 5 mL |
| - Acrilamida 40% (19 acrilamida:1 bis-acrilamida) | 5 mL |
| - dH ₂ O q.s.p. | 50 mL |

2- Agitar bem, a temperatura ambiente, até que a uréia esteja completamente dissolvida.

Adicionar então, e de modo simultâneo:

| | |
|----------------------------|--------|
| - Persulfato de amônio 10% | 400 µL |
| - TEMED | 52 µL |

3- Agitar brevemente depois da adição destes últimos reagentes, os quais catalisarão a polimerização; então colocar o gel imediatamente na placa para polimerizar.

Nota: não é necessário tratar a mistura do gel com dietilpirocarbonato (DEPC).

* *

ANEXO 19

Protocolo: Digestão Parcial de pRT 30-2 para isolamento do cassete de expressão de MoMuLV-RT.

Referência: o autor

Notas:

> Em condições padrão:

- A reação com *Bam*HI necessita de Tampão NEB 3 e BSA 100µg/mL.
- A reação com *Hind*III necessita de Tampão 2.

> Entretanto, constatamos que:

- *Bam*HI apresenta a mesma atividade cinética padrão em Tampão NEB 2 (tampão de *Hind*III).
- *Hind*III apresenta a mesma atividade cinética padrão em Tampão NEB 3 e BSA 100µg/mL (tampão de *Bam*HI).

Portanto:

1- 1º Digestão: digerir pRT 30-2 com *Hind*III:

- | | |
|-------------------------------|---------|
| - 5,0 µL Tampão NEB 2 10X | 5X |
| - 25 µL pRT 30-2 | - |
| - 5 µL Enzima <i>Hind</i> III | 50 U |
| - dH ₂ O q.s.p. | 50,0 µL |

2- Em seguida, retirar uma alíquota de 5 µL da amostra e analisar em gel de agarose 0,8% contendo Gel red 3X, para confirmar a linearização do vetor;

3- Usar todo o volume remanescente da reação (45 µL) para a 2º digestão;

4- 2º Digestão: digerir pRT 30-2 com *Bam*HI:

- | | |
|-----------------------------|---------|
| - 3,0 µL Tampão NEB 2 10X | - |
| - 45,0 µL da 1º digestão | - |
| - 2 µL Enzima <i>Bam</i> HI | 20 U |
| - dH ₂ O q.s.p. | 80,0 µL |

- 5- Incubar por exatamente 15 min.
- 6- Após os 15 min, escolher duas alternativas:
 - adicionar imediatamente Gel Red 3X e manter a amostra em gelo seco ou “freezer” - 20 para diminuir a atividade de *Bam*HI. Esperar 5 minutos e alíquotar de forma rápida o conteúdo desejado da amostra em gel de agarose tipo I (‘low melting’) 1,0%; ligar imediatamente a fonte da eletroforese; ou
 - adicionar imediatamente Gel Red 3X e alíquotar de forma muito rápida o conteúdo desejado da amostra em gel de agarose tipo I (low melting) 1,0%; ligar imediatamente a fonte da eletroforese.

Nota: o gel já deverá conter, no 1º poço, o marcador de tamanho molecular (leader) misturado com Gel Red na relação 1:1 – O *leader* servirá de guia para o corte do gene;
- 7- A eletroforese correrá sob a condição de 3,5V/cm, por aproximadamente 2 h. O gel será visualizado rapidamente em um transiluminador por emissão de luz UV, onde a banda com tamanho aproximado 2,7 kb de comprimento será “marcada”, com auxílio de um bisturi, para, em seguida, ser excisada do gel.

* *



APÊNDICES



APÊNDICE 1

- Dados sobre o vetor pRT 30-2, enviado pelo Prof. Ph.D. Stephen Goff (Columbia University)

APÊNDICE 2

- Termo de transferência de material e licença de uso para o vetor pRT 30-2 (vetor de expressão da enzima transcriptase reversa MoMULV-RT) entre a Columbia University - NY/USA e a Universidade Federal do Amazonas

APÊNDICE 3

Descrição: ORF de *alr* de *E. coli* (NC_010473)

5'-

```
ATGCAAGCGGCAACTGTTGTGATTAACCGCCGCGCTCTGCGACACAACCTGCAACGTCTTCGTGAA
CTGGCCCCTGCCAGTAAAATGGTTGCGGTGGTGAAGCGAACGCTTATGGTCACGGTCTTCTTGAG
ACCGCGGAACGCTCCCCGATGCTGACGCCTTTGGCGTAGCCCGTCTCGAAGAAGCTCTGCGACTG
CGTGCGGGGGGAATCACCAAACCTGTACTGTTACTCGAAGGCTTTTTTGTATGCCAGAGATCTGCCG
ACGATTTCTGCGCAACATTTTCATACCGCCGTGCATAACGAAGAACAGCTGGCTGCGCTGGAAGAG
GCTAGCCTGGACGAGCCGGTTACCGTCTGGATGAAACTCGATACCGGTATGCACCGTCTGGGCGTA
AGGCCGGAACAGGCTGAGGGCCTTTATCATCGCCTGACCCAGTGCAAAAAACGTTTCGTCAGCCGGTG
AATATCGTCAGCCATTTTGC GCGCGCGGATGAACAAAAATGTGGCGCAACCGAGAAAACAACCTCGCT
ATCTTTAATACCTTTTGC GAAGGCAAACCTGGTCAACGTTCCATTGCCGCGTCGGGTGGCATTCTGC
TGTGGCCACAGTCGATTTTGACTGGGTGCGCCCGGGCATCATTTTATGGCGTCTCGCCGCTGGA
AGATCGCTCCACCGGTGCCGATTTTGGCTGTCAGCCAGTGATGTCACTAACCTCCAGCCTGATTGCC
GTGCGTGAGCATAAAGCCGGAGAGCCTGTTGGTTATGGTGGAACTGGGTAAGCGAACGTGATAC
CCGTCTTGGCGTAGTCGCGATGGGCTATGGCGATGGTTATCCGCGCGCCGCGCCGTCCGGTACGCC
AGTGCTGGTGAACGGTCGCGAAGTACCGATTGTCGGGCGCGTGGCGATGGATATGATCTGCGTAGA
CTTAGGTCCACAGGCGCAGGACAAAGCCGGGATCCGGTCATTTTATGGGGCGAAGGTTTGGCCGT
AGAACGTATCGCTGAAATGACGAAAGTAAGCGCTTACGAACTTATTACGCGCCTGACTTCAAGGGT
CGCGATGAAATACGTGGATTAA-3'
```

Descrição: ORF do gene *dadX* de *E. coli* (NC_010468)

5'-

```
ATGACCCGTCCGATACAGGCCAGCCTCGATCTGCAGGCATTAACAGAACTGTCCATTGTCCGC
CAGGCCGCGACGCACGCGCGCTCTGGTCGGTGGTAAAAGCGAACGCTTACGGGCATGGTATTGA
GCGTATCTGGAGCGCGCTCGGGCCACCGATGGCTTTGCATTGCTTAACCTGGAAGAGGCAATAAC
GTTACGTGAGCGCGGCTGGAAGGACCGATCCTGATGCTGGAAGGATTTTCCATGCTCAGGATCT
GGAGATTTATGACCAGCACCGCTGACCACCTGCGTACACAGCAACTGGCAGCTCAAAGCACTGCA
AAATGCGCGGCTAAAAGCACCGTTGGATATTTATCTTAAAGTGAACAGTGGGATGAATCGGTTGGG
CTTCCAGCCCAGATCGCGTGCTTACCGTCTGGCAGCAGTTGCGGGCAATGGCGAATGTTGGCGAAAT
GACCCTGATGTCGATTTTGC CGAAGCGGAACATCCTGATGGAATTTCCGGCGCGATGGCGCGTAT
TGAGCAGGCGGCGGAGGGGCTGGAGTGTGCGCGTTCGTTGTCCAATTCGGCGGCGACTCTGTGGCA
CCCGGAAGCGCATTTTACTGGGTTCGGCCTGGCATTATTTTGTATGGCGCTTCGCCGTCCGGTCCAG
TGGCGTGATATCGCCAATACCGGATTACGTCCGGTGATGACGCTAAGCAGTGAGATTATTGGTGTG
CAGACGCTAAAAGCGGGCGAGCGTGTGGGCTACGGCGGTTCGCTATACTGCGCGCGATGAACAGCG
AATCGGCATTGTCGCCGAGGTCAGCCGACGGTTATCCGCGCCACGCGCCTACCGGTACCCCTGT
TTTAGTGAGCGGTGCGCACCATGACGGTGGGGACCGTCTCGATGGATATGCTAGCGGTGCGATTT
AACGCCTTGGCCGAGGCGGGTATTGGTACGCCGTTGAGCTGTGGGGCAAGGAGATCAAAATTG
ATGATGTCGCCGCCGCTGCCGGAACGGTGGGCTATGAGTTGATGTGCGCGCTGGCGCTACGCGTCC
CGGTTGTGACGGTGTA-3'
```

APÊNDICE 4

Artigo para Publicação

Título Proposto: “Construção de um sistema de veiculação e expressão de DNazimas para *Escherichia coli*: um protótipo para a fagoterapia”

Revista: *Em processo de escolha*

Fator de impacto: -

Qualis (CAPES): -