



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DAYANE DA SILVA SANTOS

PERFIL FENOTÍPICO DE RESPOSTA AO ESTRESSE EM LINHAGENS DE
Liquorilactobacillus vini **DEFECTIVAS PARA O GENE *relA***

Recife, PE
2022

DAYANE DA SILVA SANTOS

PERFIL FENOTÍPICO DE RESPOSTA AO ESTRESSE EM LINHAGENS DE
Liquorilactobacillus vini **DEFECTIVAS PARA O GENE *relA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientador (a): Marcos Antônio de Moraes Júnior

Coorientador (a): Allyson Andrade Mendonça

Recife, PE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Santos, Dayane da Silva

Perfil fenotípico de resposta ao estresse em linhagens de *Liquorilactobacillus Vini* defectivas para o gene *relA* / Dayane da Silva Santos. – 2022.

61 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior.

Coorientador: Allyson Andrade Mendonça

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética,
Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Bacteriologia. 2. Bactérias. 3. Genética. I. Moraes Júnior, Marcos Antônio (orientador). II. Mendonça, Allyson Andrade (coorientador). III. Título.

579

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-002

DAYANE DA SILVA SANTOS

PERFIL FENOTÍPICO DE RESPOSTA AO ESTRESSE EM LINHAGENS DE
Liquorilactobacillus vini DEFECTIVAS PARA O GENE *relA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética.

.

Aprovado em: 04/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Antônio Carlos de Freitas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o Dr. Evandro Leite de Souza (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Dedico a todos que contribuíram de alguma forma para a construção desse trabalho. Em especial, dedico aos meus pais, Josina Mariene da Silva Santos e Edvaldo Alexandre da Silva (*in memoriam*), minha base.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são inúmeros. Esse trabalho foi construído por muitas pessoas e podem ter certeza que ele é de cada um de vocês. A minha gratidão infinita a minha família, especialmente a minha mãe e minha irmã que sempre me apoiaram. Agradeço ao meu orientador, o professor Marcos Moraes, por todas as orientações recebidas e todo apoio e compressão dedicados desde o início. Ao meu coorientador Allyson Mendonça, por repassar a sua experiência com *L. vini*, pela paciência e principalmente por demonstrar que há sempre uma segunda chance. Agradeço também a todos os membros do laboratório LGM, especialmente Gilberto Henrique por ter me auxiliado desde o primeiro dia e a Karolaine pela parceria de sempre. Ao laboratório Cariolab e a professora Ana Cristina Brasileiro que nos auxiliaram na microscopia de fluorescência o meu muito obrigado. Não poderia deixar de agradecer também a professora Nara Freitas da UFRPE pela parceria desde a graduação e a amizade que me ajudou nos momentos mais difíceis a não desistir. E ao CNPQ por financiar a realização dessa pesquisa.

E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas.

(Gonzaguinha, 1982)

RESUMO

Liquorilactobacillus vini é uma bactéria ácido láctica encontrada na produção de etanol combustível no nordeste brasileiro que tem sido alvo de estudos pelo nosso grupo de pesquisa. A sobrevivência de *L.vini* aos agentes estressores presentes nas destilarias pode ser dependente da molécula sinalizadora (p)ppGpp, chamada de alarmônio, produzido pela proteína RelA que tem efeito pleiotrópico na resposta a estresse em bactérias. Por isso, o objetivo deste estudo foi determinar o papel do gene *relA* na resposta estrigente em resposta a diferentes formas de estresse, assimilação de diferentes açúcares, homeostase da parede celular e motilidade. Inicialmente foi realizado um estudo *in silico* da proteína *relA* e a via do (p)ppGpp em *L.vini*. Posteriormente, foram realizados ensaios de tolerância a diferentes formas de estresse através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (MBC), curvas de crescimento em concentração sub-MIC e indução de tolerância cruzada e curvas de lise da parede celular. Além disso, foi realizada a anotação dos genes de síntese de flagelo, microscopia de fluorescência e ensaio de motilidade nas cepas parental e *relA*-. *L.vini* apresenta uma proteína *relA* bifuncional e uma pequena sintase de alarmônio no genoma. A linhagem mutante $\Delta relA$ apresentou maior tolerância a estresse osmótico e sensibilidade ao ácido láctico em relação a linhagem parental, entretanto parede celular da linhagem mutante é muito mais frágil que na linhagem parental, indicando o papel da proteína RelA na biogênese da parede celular. Além disso, a deleção do gene *relA* também interferiu no padrão de consumo de diferentes açúcares e na motilidade celular, indicando o déficit energético do mutante. Esses dados indicam que o gene *relA* em *L. vini* tem um papel central na fisiologia indo além do esperado para um gene de resposta a estresse.

Palavras-chave: Resposta a estresse; (p)ppGpp; $\Delta relA$; Fisiologia bacteriana

ABSTRACT

Liquorilactobacillus vini is a lactic acid bacteria found in the production of fuel ethanol in northeastern Brazil, subject of studies by our research group. The survival of *L.vini* to stress present in distilleries can it be dependent on the signaling molecule (p)ppGpp, called alarmonium, produced by the RelA protein, whit a pleiotropic effect on the stress response in bacteria. Therefore, the aim of this study was to determine the role of the relA gene in the stringent response to different forms of stress, assimilation of different sugars, cell wall homeostasis and motility. Initially, there was the study an in silico study of the relA protein and the pathway of (p)ppGpp in *L.vini*. Subsequently, tolerance tests to different forms of stress were carried out by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), growth curves in sub-MIC concentration and cross-tolerance induction and cell wall lysis curves. In addition, it was performed by annotating the flagellum synthesis genes, fluorescence microscopy and motility assay in the parental and relA- strains. *L.vini* has a bifunctional relA protein and a small alarmonium synthase in the genome. The Δ relA mutant strain showed greater tolerance to osmotic stress and sensitivity to lactic acid compared to the parental strain, however the cell wall of the mutant strain is much more fragile than the parental strain, indicating the role of RelA protein in cell wall biogenesis. Furthermore, deletion of the relA gene also interfered with the pattern of consumption of different sugars and cell motility, indicating the energy deficit of the mutante. These data indicate that the relA gene in *L. vini* has a central role in physiology going beyond what is expected for a stress response gene.

Keywords: Stress response; (p)ppGpp; Δ relA; Bacterial physiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Nova classificação para o gênero <i>Lactobacillus</i> proposta por Zheng et al (2020).	17
Figura 2	Filogenia do gênero <i>Liquorilactobacillus</i> .	18
Figura 3	<i>Liquorilactobacillus vini</i> JP7. 8.9.	19
Figura 4	Representação esquemática da proteína RelA.	28
Figura 5	Estrutura química das moléculas de trifosfato de guanosina (GTP), difosfato de guanosina (GDP), pentafofato de guanosina (pppGpp) e tetrafofato de guanosina (ppGpp).	29
Figura 6	Identificação dos domínios presentes na proteína RelA.	36
Figura 7	Análise comparativa da proteína RelA de <i>L.vini</i> , <i>E.coli</i> e <i>B.subtilis</i> .	36
Figura 8	Identificação dos domínios presentes na proteína sintase de alarmônio de <i>L. vini</i> .	37
Figura 9	Vias metabólicas para a produção de (p)ppGpp em <i>L.vini</i> .	37
Figura 10	Concentração Mínima Bactericida do mutante Δ relA e JP7.8.9.	38
Figura 11	Perfil de estresse cruzado das cepas JP7.8.9 e do mutante relA.	39
Figura 12	Curva de crescimento nas concentrações sub-MIC. De JP7.8.9 e Δ relA.	40
Figura 13	Curva de lise celular na presença de lisozima.	40
Figura 14	Perfil de assimilação de diferentes fontes de carbono de <i>L. vini</i> parental e Δ relA .	41
Figura 15	Genes responsáveis pela síntese de flagelo localizados no genoma de <i>L. vini</i> .	41
Figura 16	<i>Liquorilactobacillus vini</i> visto no microscópio de fluorescência.	42
Figura 17	Ensaio de motilidade de <i>L. vini</i> Δ relA e JP7.8.9 em MRS-Ágar semi-sólido.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações mínimas inibitórias dos agentes estressores testados.	32
Tabela 2	Concentração mínima Inibitória frente aos agentes estressores das linhagens de <i>L. vini</i> JP7. 8.9 e Δ relA	32
Tabela 3	Concentrações mínimas bactericidas dos agentes estressores testados.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta reIA$	Interrupção do gene <i>reIA</i>
2CRSs	Sistema de resposta de dois componentes
$\alpha 5$	Alfa hélice C-terminal
ADI	Arginina desaminase
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina Trifosfato
BAL	Bactéria Ácido Láctica
CTD	Domínio C-terminal regulatório
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GDP	Guanosina difosfato
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
HD	Hidrolase
HPK	Proteína histidina quinase
K ⁺	Potássio
<i>L. vini</i>	<i>Liquorilactobacillus vini</i>
M	Molar
MBC	<i>Minimal Bactericidy Concentration</i>
MIC	<i>Minimal Inibitory Concentration</i>

mM	Milimolar
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NTD	Domínio N-terminal enzimático
pH	Potencial hidrogeniônico
PMF	<i>Proton Motriz Force</i>
(p)ppGpp	Penta/tetra fosfato de guanosina
pppGpp	Pentafosfato de guanosina
ppGpp	Tetrafosfato de guanosina
(p)ppGpp ⁰	Ausência de produção de (p)ppGpp
Pi	Fosfato inorgânico
RNA	Ácido ribonucléico
RR	Regulador de Resposta
RRM / ACT	Motivo de reconhecimento de RNA ou aspartato quinase, corismato e domínio TyrA
RSH	<i>Rel/SpoT homologue</i>
SAH	Small Alarmone Hydrolase
SAS	<i>Small Alarmone Synthase</i>
SYNTH	Domínio de sintetase
Sub-MIC	Concentração inferior à mínima inibitória
TGS	ThrRS, GTPase e domínio SpoT
USP	Universal Stress protein
V/V	Volume/volume
ZFD / CC	Dedo de zinco ou cisteína conservada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	O gênero <i>Lactobacillus</i> : nova classificação	16
2.2	<i>Liquorilactobacillus vini</i>	18
2.3	Resposta ao estresse nas bactérias	20
2.3.1	<i>Estresse ácido</i>	21
2.3.2	<i>Estresse osmótico</i>	23
2.3.3	<i>Estresse térmico</i>	23
2.3.4	<i>Estresse oxidativo</i>	24
2.3.5	<i>Estresse por presença de Etanol</i>	25
2.4	Resposta estrigente	26
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Linhagens e condições de cultivo	31
4.2	Identificação dos domínios de RelA em <i>L. vini</i>	31
4.3	Concentração Mínima Inibitória (MIC)	31
4.4	Concentração Bactericida Mínima (MBC)	32
4.5	Concentração Bactericida Mínima com Estresse cruzado	32
4.6	Perfil de crescimento em concentrações sub-MIC	33
4.7	Lise celular por lisozima	33
4.8	Crescimento em diferentes fontes de carbono	34
4.9	Presença de flagelo	34
4.10	Ensaio de motilidade	35
5	RESULTADOS	36
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A- CURRICULUM LATTES	

1 INTRODUÇÃO

Os seres vivos ao longo da história evolutiva desenvolveram diferentes estratégias de sobrevivência que envolve mecanismos genéticos e fisiológicos, conservados ou limitados ao habitat de origem. O estresse bacteriano é classificado como qualquer perturbação que ocasione limitação do crescimento e/ou morte celular. A bactéria ácido láctica (BAL) *Liquorilactobacillus vini* é um ótimo exemplo para o entendimento da resposta ao estresse bacteriano. É predominantemente nas dornas de fermentação de etanol no nordeste brasileiro e por isso, necessita de um conjunto de mecanismos para sobreviver e responder a agressores físicos e químicos.

A sobrevivência a estresse e carência nutricional as bactérias, com exceção das intracelulares obrigatórias, é dependente de *relA*. O gene *relA* é ativado durante a escassez de nutrientes e danos celulares, conhecida como resposta estrigente. A caracterização do gene *relA* e da proteína RelA foram realizados em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, mas os modelos propostos para esses microrganismos não são universais para as demais espécies bacterianas, pois estudos demonstram que representantes dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* apresentam mecanismos de sinalização e ação diferentes para o gene *relA*. No entanto, a resposta estrigente, desencadeada quando *relA* produz o (p)ppGpp ou alarmônio e reprograma o metabolismo ainda é pouco estudada nas bactérias ácido lácticas (BAL).

As BAL são as principais bactérias com potencial biotecnológico conhecido na indústria de alimentos, produção de biocompostos e probióticos. *L. vini*, por exemplo, possui um grande potencial na indústria pela produção de biocompostos e na fermentação do etanol combustível. Contudo, nas BALs, a resposta estrigente é compreendida apenas em *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis*. O estudo do gene *relA* pode auxiliar no entendimento das vias metabólicas fundamentais para bactérias com potencial biotecnológico. Para os *Lactobacillus*, no momento, não há conhecimento na literatura sobre como funciona a resposta estrigente. Provavelmente nesses organismos o modelo de resposta para a proteína RelA é divergente de todos propostos, pela ausência de genes e vias estudadas em outras espécies e não encontradas nos *Lactobacillus*.

Por isso, é necessário o estudo de organismos mutantes para o gene *relA*, ou seja, cepas com interrupção do gene, o que permita entender o efeito fisiológico ocasionado na célula, um modelo caracterizado para o estudo de diferentes genes. Em *L. vini*, *relA* pode ser responsável pela tolerância aos agentes estressores, regular a assimilação de carboidratos, além de ser fundamental para o metabolismo microbiano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Lactobacillus*: nova classificação

Em 1901, os *Lactobacillus* foram classificados por Beijerinck como bactérias em forma de bastonetes, Gram positivas, anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos. São bactérias ácido lácticas, pois fermentam carboidratos e produzem ácido láctico como produto final. Inicialmente, os *Lactobacillus* foram taxonomicamente agrupados de acordo com seu metabolismo de carboidratos principais, como lactobacilos homofermentativos, heterofermentativos facultativos ou heterofermentativos obrigatórios (Hammes e Vogel, 1995).

Os *Lactobacillus* são GRAS (Geralmente Reconhecidos como seguros) e compõe a maioria dos probióticos, que conferem benefícios à saúde humana e de outros organismos (Bernadeau et al. 2006). Possuem também um grande potencial biotecnológico, na conservação e textura dos alimentos (Badel et al. 2011), produção de enantiômeros de ácido láctico (Reddy et al. 2008) para a confecção de bioplásticos, assim como 1,3-propanodiol (ingrediente importante na produção de cosméticos, adesivos, plásticos e produtos têxteis). Na saúde, além do uso como probióticos, há testes para carrearem vetores vacinais (Mohamadzadeh et al. 2009). O amplo espectro de benefícios dos *Lactobacillus* está relacionado à sua diversidade.

O gênero *Lactobacillus* abrigava espécies com divergência no conteúdo genético de aproximadamente 60%. Continua segundo Duar et al. (2017) mais de 250 espécies que ocupavam diversos nichos, com diferenças no metabolismo e estilo de vida. Por isso, havia a necessidade de uma nova classificação. A reclassificação ocorreu por Zheng et al.(2020) baseada em dados genéticos e fisiológicos de todas as espécies atuais e propostas no gênero *Lactobacillus* e propuseram uma alteração da classificação feita por Beijerinck (1901).

Assim, surgiram 23 novos gêneros que eram anteriormente classificados no gênero *Lactobacillus* (Figura 1): *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agriolactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Lactobacillus*, *Ligilactobacillus* e *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*,

Limosilactobacillus , *Fructilactobacillus* , *Acetilactobacillus* , *Apilactobacillus* , *Levilactobacillus* , *Secundilactobacillus*, *Lentilactobacillus* e *Liquorilactobacillus* (Zheng et al. 2020).

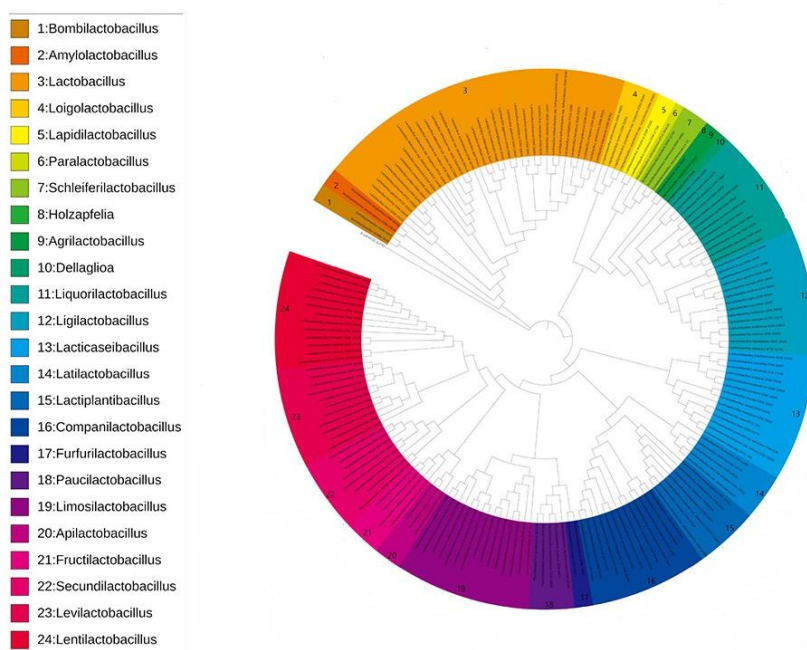


Figura 1. Nova classificação para o gênero *Lactobacillus* proposta por Zheng et al.(2020).As cores indicam as espécies distribuídas para cada gênero.

Fonte: Takenaka *et al.* (2021).

Por definição, *Liquorilactobacillus* é um *Lactobacillus* de líquidos, referindo-se ao isolamento da maioria das espécies de líquidos, incluindo água, seiva vegetal e bebidas alcoólicas, anteriormente pertencentes ao grupo *L. salivarius*. É composto por 13 espécies bacterianas: *L. mali* (espécie típica), *L. aquaticus*, *L. sicerae*, *L. hordei*, *L. cacaonum*, *L. vini*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. nagelii*, *L.oeni*, *L. satsumensis*, *L. sucicola* e *L. uvarum* (Zheng et al.2020).

São bactérias homofermentativas que produzem dextrana a partir da sacarose. A maioria das espécies é móvel (com exceção de *L. cacaonum*, *L. hordei* e *L. mali*) e com flagelos do tipo peretríquio, com exceção de *L. sicerae* que possui flagelos polares (Zheng et al. 2020). A motilidade e a presença de flagelo são importantes para as bactérias por promover uma vantagem adaptativa, pois ajudam as células a alcançar os ambientes mais favoráveis e a competir com sucesso com outros microrganismos em resposta a estímulos externos (Zhao et al. 2007).

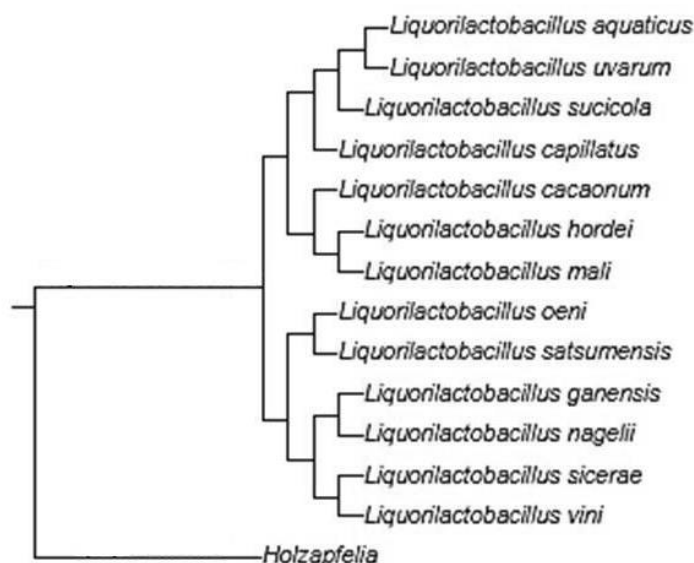


Figura 2. Filogenia do gênero *Liquorilactobacillus*.

Fonte: Zheng et al. (2020)

2.2 *Liquorilactobacillus vini*

Liquorilactobacillus vini foi descrita como espécie por Rodas et al. (2006) a partir de isolados do mosto de fermentação de uva da França e da Espanha. Possuem morfologia de bastonete e as células podem ser encontradas isoladamente, em pares ou em cadeias curtas. São Gram positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e homofermentativas de pentoses e hexoses, produzindo exclusivamente o lactato como produto final da fermentação de carboidratos (Rodas et al. 2006). Elas fermentam principalmente D-glicose, mas também podem utilizar como fonte de carbono D-frutose, sacarose, celobiose e maltose, além disso, o citrato em *L. vini* é de suma importância, pois é metabolizado em piruvato, além de aumentar a biomassa e produção de ATP (Silva et al. 2019).



Figura 3. *Liquorilactobacillus vini* JP7. 8.9.

Fonte Silva (2019)

As características singulares de *L. vini* impediram seu posicionamento a nível de espécie por muitos anos. O primeiro isolamento foi da cepa DSM 20605 (Mont4) por Barre (1978) em mosto de fermentação de uva, mas a caracterização de uma nova espécie ocorreu apenas em 2006 devido ao caráter homofermentativo obrigatório para pentoses das cepas analisadas até o momento não identificado em outras espécies bacterianas e ao avanço das técnicas moleculares que permitiu a completa diferenciação por meio do sequenciamento da região 16S RNA e posterior filogenia (Rodas et al. 2006). Em 2010, Lucena et al. isolaram de *L. vini* em dornas de fermentação de etanol na destilaria de Japangú, localizada na cidade de Santa Rita-PB. A cepa foi nomeada de JP7. 8.9.

Os genomas das linhagens DSM 20605 (Mont4) e JP7.8.9 foram sequenciados por Lucena et al. (2012) e apresentam um genoma de 2,2 Mb com 1833 gene e 2,3 Mb com 1739 genes, respectivamente e conteúdo G+C de 37.5%. Possuem em seu genoma genes para a síntese de flagelo em ambas as linhagens e foram identificados também genes que apontam para o potencial biotecnológico da espécie, como genes que codificam glicohidrolases, como celobiasas, crucial na degradação da celulose (Russel et al. 2009) e da arabinose isomerase, utilizada para a conversão de D-galactose em D-tagatose, um adoçante com sabor similar ao do açúcar convencional (Cavalcante, 2017). A presença de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis como o transposon conjugativo Tn 916 mostram a versatilidade biológica desta espécie (Mendonça et al. 2015).

L. vini é um contaminante da produção de etanol, sendo juntamente com *L. fermentum* as cepas com maior predominância nas dornas de fermentação e podem ser encontradas até 30 dias após o início do processo fermentativo de etanol combustível crescendo na presença de 10% de etanol (Lucena et al. 2012). A presença de bactérias na fermentação geralmente está associada à queda no rendimento e alteração da viabilidade das leveduras pela competição por nutrientes e/ou acidificação do meio devido a produção de lactato pelas bactérias ácido lácticas como *L. fermentum* (Skinner et al.2004).

No entanto, essa relação parece não ocorrer para *L. vini*. De acordo com Souza et al. (2012), quando *L. vini* foi adicionada a culturas de *Sacharomyces cerevisiae* não houve alteração na fermentação. Além disso, na presença da levedura *Dekkera bruxellensis* aumentou o rendimento da produção do etanol. Observação similar foi feita por Passoth et al. (2007) e afirmou que *L. vini* forma uma comunidade estável com *D. bruxellensis* além de estar bastante adaptada ao ambiente industrial.

No ambiente industrial, *L. vini* apresenta adaptações ao habitat estressante, convivendo com variações de pH, altas e baixas temperaturas, estresse osmótico e principalmente a presença de etanol no processo de fermentação de vinho e/ou etanol. Mendonça et al. (2020) verificaram que a cepa JP7.8.9 de *L. vini* apresenta tolerância significativa aos estressores comumente encontrados na fermentação de etanol combustível. Mendonça et al. (2019) estudaram a resposta ao estresse de *L. vini* e verificaram a importância das proteínas universais de resposta ao estresse (USP1, USP2, USP3, USP4 e USP5) primeiros genes de resposta ao estresse estudados nessa bactéria.

2.3 Resposta ao estresse nas bactérias

O estresse bacteriano pode ser considerado qualquer transição de uma condição para outra que causa alterações no genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma da célula, levando a um potencial de crescimento ou sobrevivência reduzido. Sob estresse, as células tentam se adaptar por meio de respostas moleculares apropriadas na tentativa de amenizar os efeitos negativos e restaurar o crescimento ou o potencial de sobrevivência (Papadimitriou et al. 2016).

As bactérias ácido lácticas, grupo que engloba *L. vini*, estão sujeitas a diferentes estresses abióticos e bióticos. Estresses abióticos são encontrados no ambiente natural, na manipulação de alimentos e de cepas probióticas, enquanto estresses bióticos são desencadeados pelos hospedeiros ou em ambientes complexos (Papadimitriou et al. 2016). A capacidade de monitorar o ambiente quanto a distúrbios químicos e físicos tóxicos é essencial para as bactérias, que vivem em ambientes dinâmicos.

No ambiente industrial, por exemplo, bactérias como *L. vini* estão sujeitas a oscilações de temperatura e pH, níveis elevados de etanol e de outros compostos tóxicos, estresses osmótico, oxidativo e presença elevada de ácido láctico. O principal alvo do estresse ambiental são as membranas, que auxiliam na sustentação das atividades celulares (Papadimitriou et al. 2016). Em resposta ao estresse ácido, osmótico, oxidativo e térmico, várias mudanças ocorrem na membrana celular, particularmente nos lipídios e ácidos graxos (Murgam et al. 2000; Guerzoni et al. 2001).

O sistema de resposta de dois componentes (2CRSs), caracterizado nas bactérias permite que elas respondam às mudanças em seu ambiente após receber um sinal ambiental nos domínios de detecção transmembrana da proteína histidina quinase (HPK) (Stock et al. 2000). Assim que recebe um sinal de entrada, a HPK é ativada para autofosforilar um resíduo específico de histidina. O grupo fosforil é então transferido para o domínio regulador do regulador de resposta (RR), que induz uma resposta transcricional por meio de seu domínio de ligação ao DNA (Robinson et al. 2000).

2.3.1 Estresse ácido

No ambiente industrial o estresse ocasionado por ácidos orgânicos como os ácidos acético e láctico são comuns. O estresse por ácido láctico é um estresse autoimposto, pois bactérias lácticas produzem lactato como subproduto principal da fermentação de carboidratos, principalmente durante a fase estacionária de crescimento e o acúmulo causa a autoacidificação do ambiente (Even et al. 2002).

Além disso, grandes quantidades de ácido acético podem ser liberadas durante a utilização da biomassa na produção industrial, o que também leva ao

aumento do estresse ácido. Mendonça et al. (2019) mostraram que o estresse por ácido (orgânico ou inorgânico) produz um efeito bacteriostático acompanhado de um aumento na resistência celular à lisozima em *L. vini*.

A acidez é um poderoso antimicrobiano, pois afeta diretamente o gradiente eletroquímico da membrana plasmática. Os ácidos ao entrar nas células podem se dissociar em próton e íon correspondente, o que acarreta aumento da acidez intracelular e distúrbios metabólicos (Trček et al. 2015; Geng et al. 2017). A bomba de efluxo de prótons dependente de PMF (força motriz do próton) é um dos mais importantes sistemas de tolerância a ácidos em bactérias na manutenção da homeostase do pH, por meio da qual o excesso de prótons é bombeado para fora do citoplasma (Jain et al. 2013).

Bombas de efluxo de prótons, como a H⁺-ATPase, exportam prótons das células com consumo de ATP (Sun 2012). Consequentemente, uma maior atividade de H⁺-ATPase e mais acúmulo de energia aumentam a capacidade das células de regular a homeostase do pH. Os aminoácidos também são importantes na tolerância a ácidos, pois auxiliam na manutenção do pH intracelular das bactérias (Senouci-Rezkallah et al. 2011).

O sistema arginina deiminase (ADI) foi identificado como um importante mecanismo de defesa em várias bactérias contra danos por ácido (Liu et al. 2015). O sistema de tolerância ao ácido dependente de glutamato também é reconhecido como crítico para as bactérias sobreviverem em ambientes ácidos (Reeve e Reid, 2016).

Em ambos os sistemas, ocorre à neutralização de prótons e produção de ATP que impulsiona a Bomba de efluxo de prótons dependente de PMF (Guan et al. 2013). Mendonça et al. (2019) mostraram que *L. vini* responde a acidificação através da entrada precoce na fase estacionária, disparando os sinais de remodelação da parede celular e manutenção do pH intracelular de forma coordenada, provavelmente por alcalinização e bombas de extrusão de prótons. Esse mesmo estudo revelou que a presença de alguns aminoácidos no meio, dentre eles a arginina, protege a células contra os efeitos tóxicos da acidificação do meio (Mendonça et al. 2019).

2.3.2 Estresse osmótico

O cloreto de sódio é essencial para manter o equilíbrio eletrolítico dos fluidos de muitos seres vivos. No entanto, níveis elevados de NaCl alteram a osmolaridade externa do ambiente e desencadeiam nas bactérias fluxos de água para o exterior da célula ocasionando plasmólise e desidratação. No entanto, níveis de NaCl maiores no interior celular (ambiente hipotônico) o fluxo de água é destinado por osmose para o citoplasma ocasionando turgor e consequentemente lise celular (Sleator e Hill 2002).

A resposta dos procariotos a um ambiente hipertônico pode ser dividida em resposta primária e resposta secundária. Na resposta primária, ocorre o *pool* de K⁺ e glutamato por adsorção/síntese (Epstein 1986). Na resposta secundária, há o rápido aumento na concentração citoplasmática de compostos osmoprotetores, ou solutos compatíveis, como também são conhecidos (Yancey et al. 1982). Essa resposta é caracterizada para as bactérias Gram negativas. As Gram positivas, sem estresse osmótico, já possuem um *pool* elevado de aminoácidos, principalmente glutamato, além das concentrações de potássio muito mais elevadas em relação às Gram negativas e possuem consequentemente maior pressão de turgor (Caley et al. 1991).

Portanto, em um ambiente hipertônico, a defesa ao estresse osmótico nas Gram positivas ocorre principalmente pelo acúmulo de osmoprotetores, como a glicina betaína, carnitina e prolina, em ordem decrescente de importância (Beumer et al. 1994) que podem ser acumulados em altas concentrações sem afetar as atividades celulares por não apresentarem carga iônica em ambiente aquoso (Galinsk et al. 1995). Booth e Higgins (1990) indicam que a função do acúmulo de K⁺ é a sinalização para a resposta secundária, funcionando como um segundo mensageiro.

2.3.3 Estresse térmico

A elevação da temperatura no ambiente pode danificar a membrana plasmática bacteriana e desnaturar proteínas. Quando as células da bactéria são expostas a temperaturas mais altas, um conjunto de proteínas de choque térmico (HSPs) é induzido rápida e temporariamente para lidar com o aumento do dano nas

proteínas (Yura et al. 1993). As HSPs, principalmente as chaperonas GroEL/GroEs facilitam o dobramento adequado de proteínas celulares e a protease dependente de Clp ATP que degradam proteínas incorretamente dobradas são essenciais para superar as mudanças que envolvem a desnaturação de proteínas (Maleki, 2016). Muitas bactérias regulam a expressão das chaperonas durante o choque térmico pelo sistema HrcA-CIRCE. O elemento de DNA denominado CIRCE atua como sítio de ligação para a proteína repressora HrcA em condições sem estresse térmico.

Segundo Schäfer et al. (2020), em *Bacillus subtilis* os alarmônios (p)ppGpp produzidos pelo gene *relA* também estão envolvidos na resposta ao estresse térmico, bem como no desenvolvimento de resistência térmica. Após o choque térmico, os níveis intracelulares de (p)ppGpp aumentam rapidamente de forma transitória. O (p)ppGpp induzido pelo calor é produzido pela sintetase de alarmônio Rel associada ao ribossomo, enquanto as pequenas sintetases de alarmônio RelP e RelQ parecem não estar envolvidas.

Além disso, o estudo demonstra que durante o estresse térmico (p)ppGpp atua principalmente a nível da tradução e apenas genes específicos são regulados a nível da transcrição como *hpf*, que codifica o fator de promoção da hibernação para a proteção do ribossomo. Os alarmônios parecem interagir com a atividade do fator de transcrição de estresse Spx durante o estresse por calor.

2.3.4 Estresse oxidativo

As bactérias ácido lácticas são caracterizadas por não conter uma cadeia respiratória. No entanto, a maioria das BAL pode crescer em condições aeróbicas e consumir oxigênio molecular por flavoproteínas oxidases únicas (Yamamoto et al. 2006). Bactérias lácticas, como *Enterococcus faecalis* (Winstedt et al. 2000) e *Lactococcus lactis* (Duwat et al. 2001), constroem uma cadeia respiratória funcional quando uma fonte de heme, um cofator essencial das citocromo oxidases é fornecido. Outras, como *Lactobacillus plantarum* (Brooijmans et al. 2000) e *Streptococcus agalactiae* (Yamamoto et al. 2005), possuem metabolismo respiratório quando heme e quinona são fornecidas. A presença de oxigênio endogenamente na célula gera subprodutos, o que precisa ser eliminado.

Os subprodutos do metabolismo do oxigênio ou simplesmente espécies reativas de oxigênio (ROS) mais comuns são superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), eles danificam as células bacterianas, pois o estresse oxidativo pode resultar em danos ao esqueleto e às bases dos ácidos nucleicos, aos aminoácidos oxidados livres e incorporados, além de cofatores das proteínas. As oxidações dependentes de ROS de nucleobases de DNA (por exemplo, 8-oxo-G) ou lesões de estrutura de DNA (quebras de fita simples; SSB) são reconhecidas e desencadeiam respostas transcricionais mediadas por fatores de transcrição induzidos por estresse oxidativo (por exemplo, OxyR, PerR, SoxR).

Já a tradução bacteriana é afetada por lesões oxidativas, nos fatores de alongamento (EF-Tu, EF-G), nas proteínas ribossômicas e nas principais espécies de RNA da máquina de tradução (tRNA, rRNA) (Fasnacht;Polacek, 2021). Para a proteção da célula contra os danos ocasionados pelos ROS, as bactérias desenvolveram enzimas como a superóxido dismutase (SODs) para converter $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 , assim como catalases (ausentes nas BAL) e peroxidases para remover H_2O_2 e neutralizar continuamente as ROS produzidas (Imlay, 2008).

O gene *relA* também pode estar associado a proteção ao estresse oxidativo. Gaca et al. (2013) identificaram que o mutante de *Enterococcus faecalis* deficiente na produção do alarmônio produz altos níveis de H_2O_2 , cerca de 6,8 vezes mais H_2O_2 que o tipo parental na log precoce, semi-log, e nas fases de crescimento logarítmica tardia. Este aumento de H_2O_2 sugere ainda que a (p)ppGpp0 é incapaz de manter um metabolismo equilibrado. Além disso, de acordo com Abranches et al. (2009) surpreendentemente, a cepa (p)ppGpp0 cresceu mais rápido e com maior rendimento de crescimento que a cepa parental na presença de H_2O_2 , mas a cepa $\Delta relA$ era mais sensível a H_2O_2 .

2.3.5 Estresse por presença de Etanol

A presença de etanol no ambiente pode ocasionar nas bactérias danos à membrana celular, redução do potencial de prótons da membrana, produção de ROS e redução da reticulação de peptidoglicano na parede celular (Cao et al. 2017). O etanol na célula rompe e danifica a parede celular e as membranas, resultando em aumento do estresse oxidativo e hipóxico (Pérez-Gallardo et al.

2013), diminui o potencial de prótons através da membrana devido ao dano da membrana e juntamente com a hipóxia e leva à redução da produção de ATP pela respiração aeróbica (Cartwright et al. 1986). Esses impactos estão funcionalmente ligados e resultam em redução da viabilidade e crescimento das células afetadas.

Segundo Hugenholtz (1993), a resposta ao estresse do etanol em bactérias lácticas ativa metabolismo do citrato (citCDEF operon) e é acompanhada pelo aumento da utilização do citrato do meio. Análises transcriptômicas identificaram a expressão diferencial de genes associados à parede celular sob estresse por etanol (Van Bokhorst-Van De Veen et al, 2011).

2.4 Resposta estrigente

A resposta estrigente é um mecanismo de sobrevivência desencadeado pelas proteínas RelA/SpoT e é conservado em praticamente todas as bactérias conhecidas (exceto as intracelulares obrigatórias) (Irving; Choudhury; Corrigan et al. 2021). Também é encontrado em plantas e algas verdes (Takahashi; Kasai; Ochi, et al. 2004), e as enzimas direcionadas ao cloroplasto relacionadas às sínteses de *E. coli* RelA/Spot são difundidas entre os eucariotos fotossintéticos (Avilan et al. 2019).

Inicialmente a resposta estrigente foi estudada nos organismos modelos *Escherichia coli* (Carneiro et al. 2011) e *Bacillus subtilis* (Ochi et al. 1981) como resposta à carência de aminoácidos, mas com o avanço do conhecimento descobriu-se também a atuação da resposta estrigente em diferentes condições de estresse (Roghianian et al. 2019), inanição de ácidos graxos (Pulschen et al. 2016), ferro (Miethke et al. 2006) e fontes de carbono (Xiao et al. 1991). Na resposta estrigente, há uma remodelação do metabolismo central em resposta ao estresse ou carência nutricional durante a fase estacionária de crescimento.

O crescimento de bactérias contém uma curva de crescimento clássica composta pela fase lag, uma fase exponencial e uma fase estacionária (Pletnev et al. 2015). RelA medeia o acúmulo rápido de (p)ppGpp, um nucleotídeo hiperfosforilado (Figura 5) durante a saída da fase exponencial para a entrada na fase estacionária, preparando as bactérias para a carência nutricional, acúmulo de produtos metabólicos tóxicos e a cessação do crescimento. As condições ambientais da fase estacionária são estressantes, aumentando assim a taxa de mortalidade das

células (Sun et al. 2010). Nessa fase, são priorizadas a transcrição e tradução de proteínas para a biossíntese de aminoácidos e de resposta ao estresse, por meio da competição dos fatores sigma alternativos com o fator sigma 70, pela ligação com a RNA polimerase. Outras funções como a divisão celular e replicação do DNA são suspensas temporariamente, até o reestabelecimento das condições favoráveis de crescimento (Metzger et al. 1988).

As chaves da resposta estrigente são as longas proteínas RSH (Rel/SpoT homologue), produtoras do penta ou tetrafosfato de guanosina, mais conhecido como alarmônio ou (p)ppGpp e as pequenas sintase e hidrolase de alarmônio (Small alarmone syntase e Small alarmone hydrolase) (Potrykus e Cashel 2008). Há diferenças entre bactérias Gram positivas e Gram negativas quanto a proteína RSH. Nas bactérias Gram negativas como *E.coli* duas proteínas são fundamentais para a síntese e degradação do (p)ppGpp : RelA e SpoT. RelA é uma proteína relacionada a síntese do alarmônio (sintase) e SpoT possui a função de degradação (hidrolase) e fraca atividade de síntese. RelA e SpoT também respondem a estímulos de forma diferente.

Enquanto RelA precisa da carência de diferentes aminoácidos, a ausência de apenas um é suficiente para estimular SpoT (Battesti e Bouverete 2009). Evolutivamente, houve uma duplicação da proteína Rel ancestral nas bactérias Gram negativas para a formação de RelA e SpoT, mas durante o tempo de divergência foram moduladas para ganhar diferentes funções.

A proteína RelA de *E.coli* não apresenta o domínio hidrolase, mas os outros domínios são equivalentes aos de SpoT. As proteínas RSH consistem em um domínio N-terminal enzimático (NTD) e um domínio C-terminal regulatório (CTD). O NTD compreende um domínio de hidrolase (HD) que pode degradar (p) ppGpp em GTP ou GDP e PPi, e um domínio de sintetase (SYNTH) que converte GTP / GDP e ATP em (p) ppGpp. A região regulatória CTD contém um ThrRS, GTPase e domínio SpoT (TGS), um domínio alfa helicoidal conservado, um dedo de zinco ou cisteína conservada (ZFD / CC) e um motivo de reconhecimento de RNA ou aspartato quinase, corismato e domínio TyrA (RRM / ACT). Pequenas enzimas de alarmona sintetase (SAS) contêm um único domínio SYNTH e uma hélice alfa C-terminal ($\alpha 5$), que é necessária para a tetramerização de SAS. Pequenas proteínas de alarmonônio hidrolase (SAH) contêm um único domínio HD (Irvan; Corrigan 2018; Brown et al. 2016).

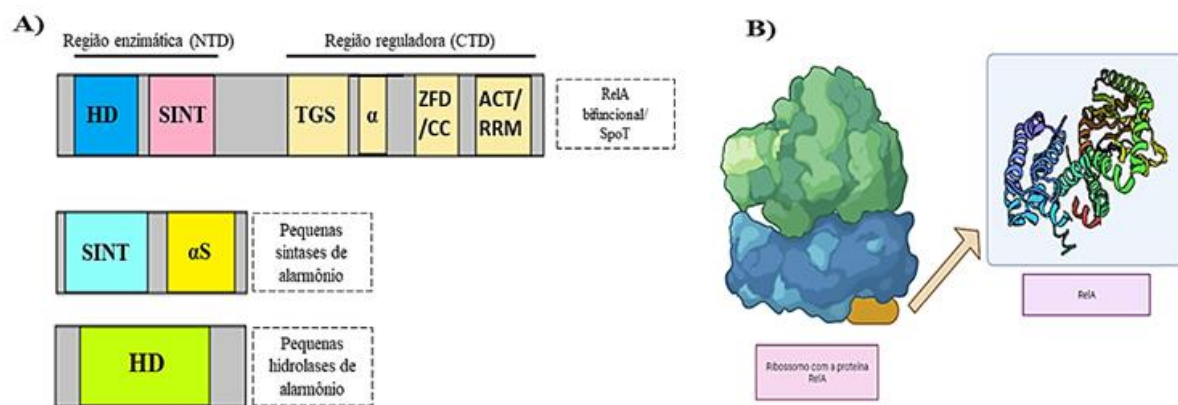


Figura 4. A) Representação esquemática dos domínios das proteínas RSH, SAS e SAH. B) Proteína RelA ligada ao ribossomo.

Fonte: Autor

Nas bactérias Gram positivas como *L. vini* existe no genoma o gene para codificar a proteína bifuncional RelA. Essa proteína está ligada à subunidade menor do ribossomo 70s e é responsável pela síntese e degradação do alarmonio (ppGpp). Estudos preliminares mostraram que RelA estava ativa apenas durante a resposta estridente, mas atualmente foi demonstrada a importância de RelA e síntese basal de (p)ppGpp durante o crescimento exponencial (Fernández-Coll; Cashel 2020).

Durante a resposta estridente, RelA é estimulada pela chegada de RNAs transportadores descarregados no sítio A do ribossomo. A falta de aminoácidos provoca a parada da síntese proteica e RelA começa a sintetizar (p)ppGpp com maior intensidade, convertendo GDP ou GTP + pi em (p)ppGpp + AMPc, esse último é um sinalizador de falta de energia. O grupo pirofosfato de pppGpp e ppGpp na posição 3' hidroxil (OH) é transferido do ATP pela (p)ppGpp sintetase (Anderson et al. 2019).

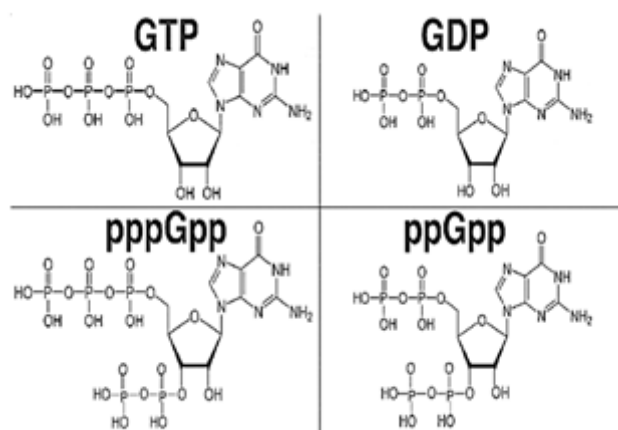


Figura 5. Estruturas químicas de moléculas de trifosfato de guanosina (GTP), difosfato de guanosina (GDP), pentafofato de guanosina (pppGpp) e tetrafofato de guanosina (ppGpp).

Fonte: Das et al. (2020)

Uma cepa (p)ppGpp nula, ou seja, não há síntese de alarmônio ocasiona em um fenótipo “relaxado”. Não há a reorganização do metabolismo e a célula morre devido às desordens metabólicas ocasionadas pelo estresse (Mechold;Malk 1997). O alarmônio produzido a partir da síntese com o GTP diminui os níveis da molécula, o que é percebido pelo repressor pleiotrópico CodY. O repressor está ligado a aminoácidos de cadeia ramificada (Leucina, isoleucina e valina) e GTP e atua na repressão de genes de resposta ao estresse e biossíntese de aminoácidos.

Na diminuição dos níveis de GTP o CodY é liberado e os fatores sigma alternativos estimulam a RNA polimerase II a traduzir a região anteriormente bloqueada (Brown et al. 2016). No entanto, nenhum gene homólogo a codY foi encontrado no genoma das espécies pertencentes ao grande gênero *Lactobacillus* (atualmente compõe 23 gêneros) e também não foram identificados fatores sigma alternativos de resposta ao estresse. Por isso, pouco se conhece sobre a resposta estrigente neste grupo.

Além da função na resposta estrigente, (p)ppGpp produzido por RelA também desempenha papéis importantes na virulência bacteriana (Dalebroux et al. 2010), esporulação (Crawford e Shimkets, 2000), formação de biofilme (He et al. 2012), e resistência a antibióticos (Wu et al. 2010 ; Strugeon et al. 2016). Bactérias patogênicas utilizam redes de sinalização de (p)ppGpp para modular a expressão de genes dos sistemas de secreção, componentes flagelares, adesinas e serina/metaloproteases (Dalebroux et al. 2010; Pal et al. 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinação do perfil fenotípico da bactéria *Liquorilactobacillus vini* JP7.8.9 parental e defectiva para o gene *relA* em condições de estresse e assimilação de fontes de carbono.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar o efeito da mutação $\Delta relA$ na tolerância de *L. vini* a diferentes formas de estresse.
2. Determinar o efeito da mutação $\Delta relA$ na assimilação de *L. vini* a diferentes fontes de carbono
3. Compreender o efeito da mutação $\Delta relA$ na lise da parede celular bacteriana em *L. vini*
4. Analisar o efeito da mutação $\Delta relA$ na motilidade de *L.vini*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens e condições de cultivo

A cepa de *Liquorilactobacillus vini* JP7. 8.9 foi isolada por Lucena (2010) em dornas de fermentação de etanol combustível na destilaria de Japangú, localizada na cidade de Santa Rita-PB. As células foram cultivadas em meio MRS (Man, Rogosa and Sharp) a 37°C por 48 horas e posteriormente estocadas a -80°C em eppendorfs contendo 20% de glicerol onde permanecem até o presente momento. Duas cepas isogênicas de *L. vini* JP7. 8.9 com interrupção do gene *relA* foram desenvolvidas por Mendonça (2018). *L. vini* defectivas para o gene *relA* foram acrescidos ao cultivo em MRS 7ul/mL de eritromicina. Para a realização de todos os experimentos, as três cepas de *L. vini* foram cultivadas em duplicata em meio MRS por 24 ou 48 horas a 37°C e posteriormente ressuspensas no mesmo meio e incubadas a 37°C por 3 horas.

4.2 Caracterização *in silico* de RelA em *L. vini*

O genoma de *L. vini* foi anotado no software RAST Annotation (Azis et al, 2008) e a sequência de aminoácidos foi adicionada ao Hmmer Web server (Potter et al.2018) para análise de domínios e semelhança da sequência. Para a análise da via do (p)ppGpp em *L.vini* foi utilizada a plataforma Biocyc (Karp et al. 2019). Para verificar a estrutura da proteína relA foi consultado o Repositório SWISS-MODEL (Biernert et al, 2016).

4.3 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

As cepas de *L. vini* JP7.8.9 e dos mutantes *relA* foram cultivadas em duplicata biológica em MRS a 37°C por 24 horas. Posteriormente houve a ressuspensão nas mesmas condições por 3 horas. Em seguida, a densidade óptica foi mensurada em uma absorbância de 600nm e ajustada para 0,005. Foram analisados os agentes estressores nas concentrações padronizadas (tabela 1): ácido láctico, acetato, ácido clorídrico, cloreto de sódio, temperatura, peróxido de hidrogênio e etanol adicionados ao meio MRS. As análises foram realizadas em duplicata biológica e triplicata técnica.

No controle positivo o cultivo foi realizado na ausência do estressor em meio MRS e o meio MRS + estressor como controle negativo.

Tabela 1. Concentrações mínimas inibitórias dos agentes estressores testados.

Estressor		Concentrações	
Ácido láctico	100mM	150mM	200mM
Ácido acético	500mM	550mM	600mM
Ácido clorídrico	pH 3,5	pH 3,0	pH 2,5
Etanol	10% (v/v)	12% (v/v)	15% (v/v)
Cloreto de Sódio	0,5M	0,8M	1M

4.4 Concentração Bactericida Mínima (MBC)

L. vini JP7.8.9 e os mutantes *relA* foram cultivadas e o pré-cultivo nas mesmas condições da MIC descritas no item 4.3. Posteriormente, a DO foi padronizada para 0.1 e adicionados ao meio MRS-caldo os agentes estressores separadamente: ácido láctico, ácido acético, NaCl, etanol, HCl, temperatura e peróxido de hidrogênio, nas concentrações descritas na tabela 3. Foram retiradas nos intervalos 0, 24 e 48 horas alíquotas de 2,5 µl dos cultivos contendo os agentes estressores e foram inoculadas em placas de MRS-Ágar e incubados na estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Os testes foram realizados em duplicata biológica. No controle positivo a bactéria foi inoculada na ausência do estressor em meio MRS e o meio MRS + estressor como controle negativo.

Tabela 2. Concentrações mínimas microbicidas dos agentes estressores testados.

Estressor		Concentrações	
Ácido láctico	100mM	150mM	200mM
Ácido acético	500mM	550mM	600mM
Ácido clorídrico	pH 2,5	pH 2,0	pH 1,5
Etanol	10% (v/v)	12% (v/v)	15% (v/v)
Cloreto de Sódio	1.8M	2.0M	2.2M

4.5 Concentração Bactericida Mínima com Estresse cruzado

As células bacterianas *L. vini* parental e mutante *relA* foram cultivadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, houve um cultivo de 3 horas na mesma temperatura. Em

seguida, a DO foi ajustada para 1,0 em meio MRS-Caldo acrescido dos agentes estressores nas concentrações sub-MIC (ácido láctico 60 mM, ácido acético 150 mM, NaCl 0,6 M, etanol 8,5% (v/v) e HCl 0,1 mM (pH 4)) e incubadas por 1 hora a 37°C na estufa. O controle positivo foi realizado com as células isentas do estressor e o controle negativo apenas com o MRS + estressor, isenta de inóculo bacteriano. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionadas ao meio MRS com os estressores nas concentrações padronizadas para a MBC (tabela 2). As alíquotas foram coletadas no intervalo de 0, 24 e 48 horas e inoculadas em placas contendo MRS-ágar. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C na estufa bacteriológica. Foi observada a presença ou ausência de crescimento nas condições testadas.

4.6 Perfil de crescimento em concentrações sub-MIC

O cultivo das linhagens JP7.8.9 e o mutante relA foi realizado em MRS-caldo e incubadas na estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, foi adicionado MRS-caldo e incubados a 37°C por 3 horas. A DO foi ajustada para 0,1 em eppendorfs contendo 1mL de meio MRS com os agentes estressores nas concentrações sub-MIC descritos no item 4.5. 150ul do cultivo foram inoculados em placas de microtitulação de 96 poços e fundo chato. Em seguida, foi incubada a 37°C por 48 horas no leitor de microplaca (Synergy HTX), com leituras em 600nm de comprimento de onda e no intervalo de 30 minutos. O experimento foi realizado em réplica biológica e duplicata técnica. No controle positivo a bactéria foi inoculada na ausência do estressor em meio MRS e o meio MRS + estressor como controle negativo. Foi realizada uma análise estatística dos dados para verificar a média e desvio padrão entre as amostras.

4.7 Lise celular por lisozima

As células diluídas para DO de 0,1 a 600 nm em MRS contendo 60 mM de ácido láctico, ácido acético 150 mM, cloreto de sódio 600 mM, H⁺ μM (meio ajustado para pH de 3,5 com HCl) e incubado na estufa bacteriológica por 60 min a 37°C. Como controle positivo, as células foram diluídas em MRS e incubadas sem tratamento.

Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas no tampão STE (300 mM de sacarose, 100 mM de tris-HCl e 500 mM EDTA-NaOH, pH 8) contendo lisozima Egg a 10 mg/mL. As suspensões foram transferidas (150 µL) para placas de microtitulação e incubadas a 37°C a 600nm de absorvância. As variações na absorvância foram registradas a cada 30 min por 24 h no Sinergy HT dispositivo multileitor. Como controle negativo, células não tratadas foram incubadas sem enzima. Os experimentos em todas as condições foram realizados em duplicata biológica, com triplicatas técnicas cada. Foi realizada uma análise estatística dos dados para verificar a média e desvio padrão entre as amostras.

4.8 Crescimento em diferentes fontes de carbono

O cultivo das linhagens JP7.8.9 e do mutante relA foi realizado em meio MRS caldo contendo glicose por 24 horas. A DO foi ajustada para 0.1 em MRS-caldo contendo as fontes de carbono separadamente na concentração de 2%: glicose, xilose, sacarose, maltose e celobiose. 150ul do cultivo inoculados em placas de microtitulação de 96 poços e fundo chato As leituras inicial (0h) e final (24 horas) foram realizadas no multileitor Sinergy HT com a leitura a 600nm.

4.9 Presença de flagelo

O genoma de *L. vini* JP7. 8.9 foi anotado pelo software RAST-Rapid Annotation using Subsystem Technology (Aziz et al. 2008) - e os genes de síntese de flagelo foram agrupados e classificados baseados no modelo proposto para *Bacillus subtilis*. Para a confirmação da presença do flagelo de *L. vini* foi usada microscopia de fluorescência. A microscopia de campo amplo foi realizada usando uma lâmpada de arco para excitação e uma câmera de dispositivo de carga acoplada para detecção (conjunto de filtro azul e objetiva de 100x). Para a preparação das lâminas, as células de JP7.8.9 e de relA foram incubadas em meio MRS caldo por 24 horas a 37°C. A suspensão bacteriana (20 µL) foi depositada na lâmina de vidro e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Um total de 1 µL da solução DAPI (4,6 diamidino2-phenylindole) ou Calcofluor White foi depositado na lâmina para que a coloração cobrisse todo o local da deposição bacteriana inicial. A lâmina foi incubada ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante 20 minutos.

4.10 Ensaio de motilidade

Para o ensaio de motilidade, as cepas de *L. vini* parental e Δ relA na DO de 1,0 foram inoculadas em placas de petri contendo o meio MRS-Ágar sólido na concentração de 1,5%. 2ul da cultura bacteriana foram adicionados ao centro da placa e em seguida foi adicionado o meio MRS-ágar semissólido na concentração de 0,5% de ágar e incubadas a 37°C na estufa por 48 horas. O ensaio foi realizado em duplicata. Os halos formados foram medidos em centímetros e comparados.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação dos domínios da proteína RelA de *L. vini*

As análises in silico mostraram que proteína RelA de *L. vini* é bifuncional. Possui 741 aminoácidos e apresenta os domínios hidrolase, RelA_SpoT, TGS, RelA_AH_RIS e ACT e os sítios de ligação a magnésio, zinco e a outros metais, sítio ativo de sintetase e sítio de ligação a NTP, característicos de uma proteína funcional (Figura 6).

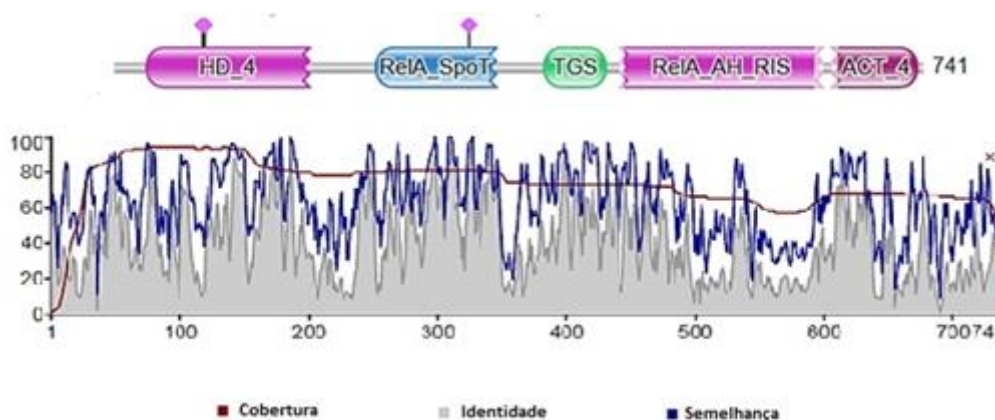


Figura 6. Domínios presentes na proteína RelA de *L. vini* JP7.8.9 identificados pelo Hmmer.

A análise comparativa dos domínios de RelA de *L.vini*, *B.subtilis* e *E.coli* demonstrou que a proteína RelA de *L.vini* é bifuncional, com domínios ativos de síntese e hidrólise de (p)ppGpp, semelhante a *B.subtilis* e diferente da proteína RelA monofuncional de *E.coli*. A estrutura da proteína RelA também se assemelha a de *B.subtilis*.

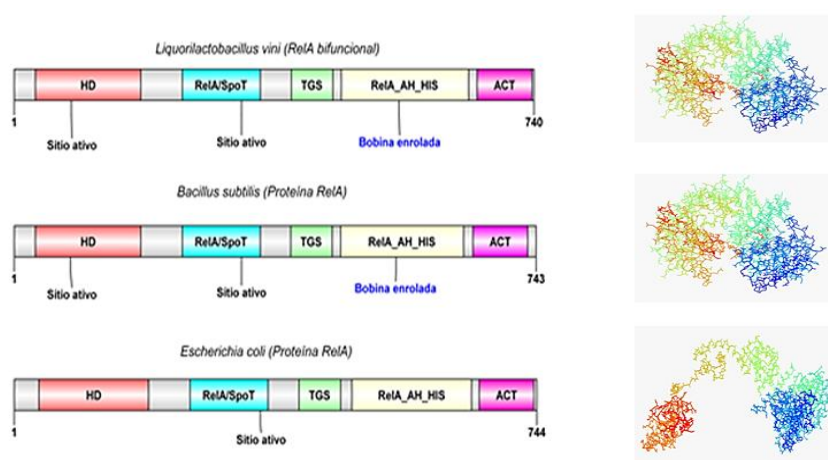


Figura 7. Comparação dos domínios e sítios ativos presentes na proteína RelA em *L.vini*, *B.subtilis* e *E.coli*.

Além da proteína bifuncional RelA, o genoma de *L. vini* possui outro gene de síntese de alarmônio, que codifica a proteína conhecida como Small alarmone sintase ainda pouco conhecida nos *Lactobacillus* com 210 aminoácidos e o domínio sintase de alarmônio (Figura 8).

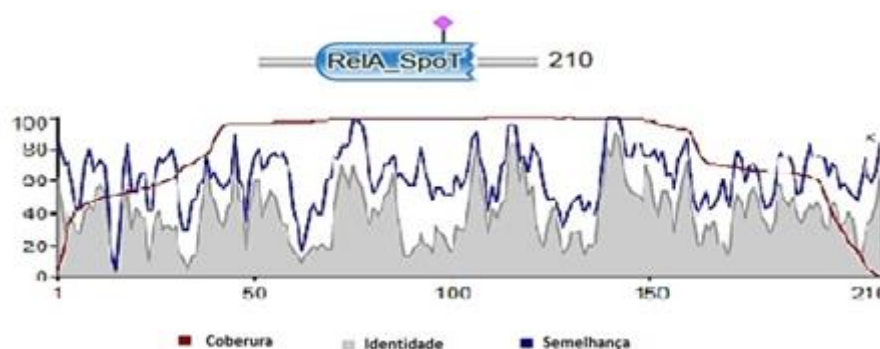


Figura 8. Identificação dos domínios presentes na proteína sintase de alarmônio de *L. vini*.

As vias de síntese e degradação do (p)ppGpp estão completas e funcionais de acordo como BioCyc e estão presentes a proteína bifuncional (p)ppGpp sintase/guanosina 3',5'-bis(difosfato) 3'-pirofosfohidrolase, que é conhecida como RelA, com a função de síntese e degradação do (p)ppGpp, a GDP pyrophosphokinase, conhecida também como small alarmone sinthase, com a função de síntese de ppGpp e a nucleosídeo difosfato quinase que sintetiza a formação de GDP a partir de GTP via desfosforilação.

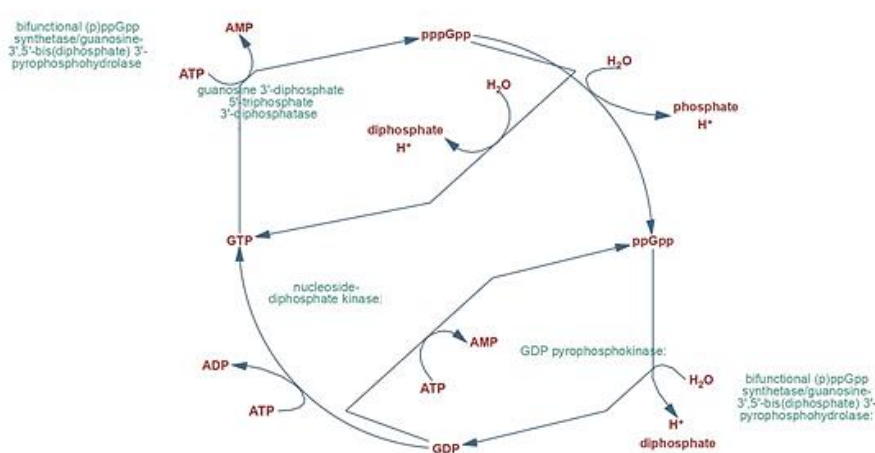


Figura 9. Vias metabólicas para a produção de (p)ppGpp em *L. vini*.

5.2 Concentração Mínima Inibitória

As linhagens $\Delta relA$ de *L. vini* foram tolerantes às concentrações bacteriostáticas, ou maior MIC para NaCl (800mM), acetato (220mM) e peróxido de hidrogênio em comparação a cepa parental JP7.8.9. Não houve diferença para as concentrações de lactato (100 mM), etanol (10% v/v) e pH (3,0) (Tabela 1).

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória frente aos agentes estressores das linhagens de *L. vini* JP7. 8.9 e $\Delta relA$.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)		
Estressores	JP7. 8.9	$\Delta relA$
Ácido Lático	100 mM	100 mM
Ácido Acético	200 mM	220 mM
Etanol	10% (v/v)	10% (v/v)
NaCl	500 mM	800 mM
HCl (pH)	3,0	3,0

5.3 Concentração Mínima Bactericida (MBC)

O $\Delta relA$ foi tolerante, ou seja, maior MBC à presença de NaCl, semelhante a MIC e menor MBC, ou maior sensibilidade ao pH baixo (2,0) em comparação à cepa parental JP7.8.9 (Figura 10). A MBC da cepa $\Delta relA$ foi igual a de JP7.8.9 para etanol, lactato e HCl.

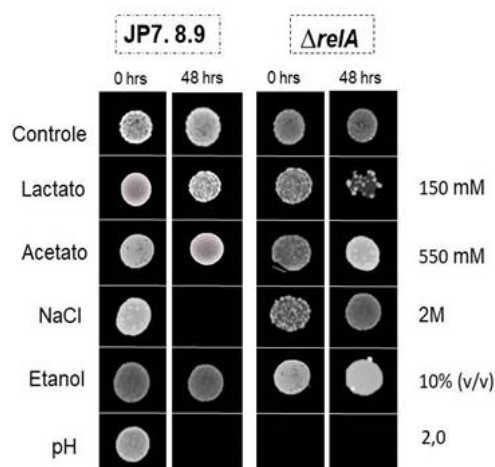


Figura 10. Concentração Mínima Bactericida do mutante $\Delta relA$ e JP7.8.9. A presença dos halos formados nas placas de cultura indicam a viabilidade celular.

5.4 Concentração Mínima Bactericida no estresse cruzado

A cepa de *L. vini* defectiva para *relA* tratada com lactato na concentração sub-MIC tornou-se sensível (menor MBC) para lactato e etanol, e a cepa parental apenas para etanol. No tratamento com acetato, o mutante $\Delta relA$ foi tolerante para acetato e JP7.8.9 para lactato. Já para NaCl, o mutante mostrou maior sensibilidade para lactato, acetato, NaCl e etanol. Em contrapartida, na cepa parental, o NaCl afetou a sensibilidade apenas para etanol. HCl (pH) no mutante o sensibilizou para todos os estressores testados. Mas para a cepa parental, a sensibilização ocorreu para os estressores pH, acetato e lactato. O etanol sensibilizou o mutante em todas as condições testadas e JP foi sensibilizada para acetato, lactato e HCl (pH) (Figura 11).

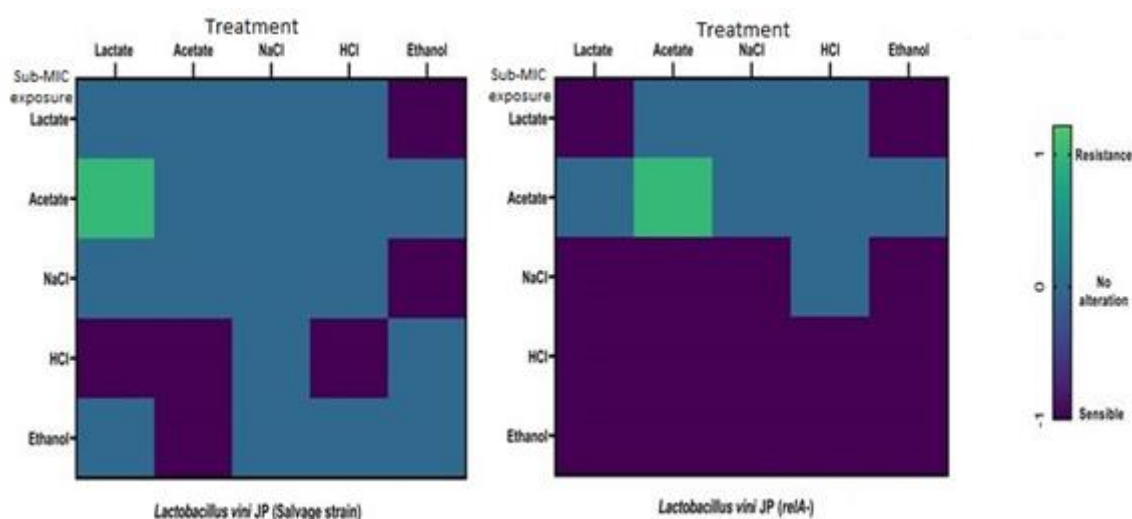


Figura 11. Perfil de estresse cruzado das cepas JP7.8.9 e do mutante *relA*.

5.5 Perfil de crescimento em concentrações sub-MIC

Os agentes estressores nas concentrações sub-MIC afetaram o perfil de crescimento do $\Delta relA$. Em relação ao controle positivo apenas com glicose, $\Delta relA$ obteve um perfil de crescimento superior para etanol, inferior para ácido láctico e acético e NaCl e não houve crescimento com HCl 0,1 mM (pH 4). Padrão semelhante foi observado na cepa parental JP7.8.9 (Figura 12).

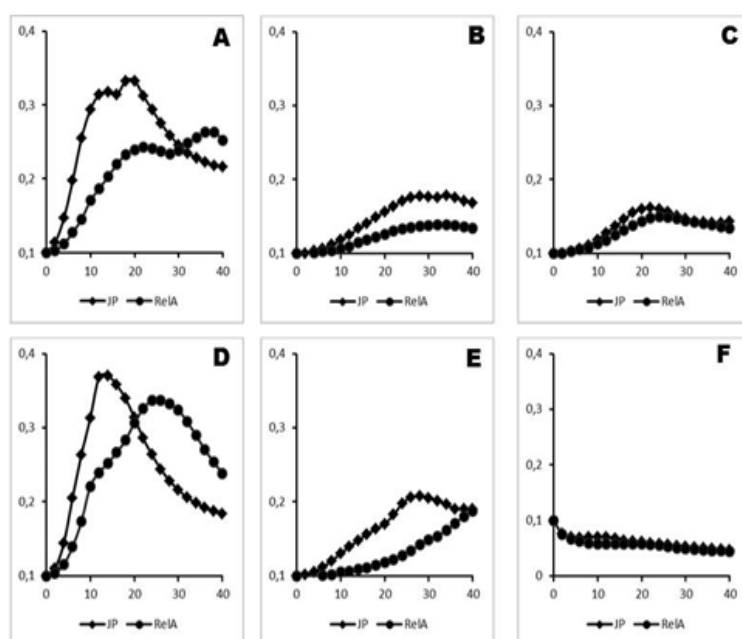


Figura 12. Curva de crescimento do $\Delta relA$ nas concentrações sub-MIC .JP7.8.9 e $\Delta relA$. A) Controle, B) Lactato (60mM), C) Acetato, D) Etanol (8.5% v/v), E) NaCl (600mM) e F) pH 3,5

5.6 Lise celular por lisozima

O $\Delta relA$ possui a parede celular mais sensível para a presença da lisozima em comparação a cepa parental, pois a lise ocorreu também no tampão de lise sem lisozima (Controle negativo), como mostra a Figura 12.

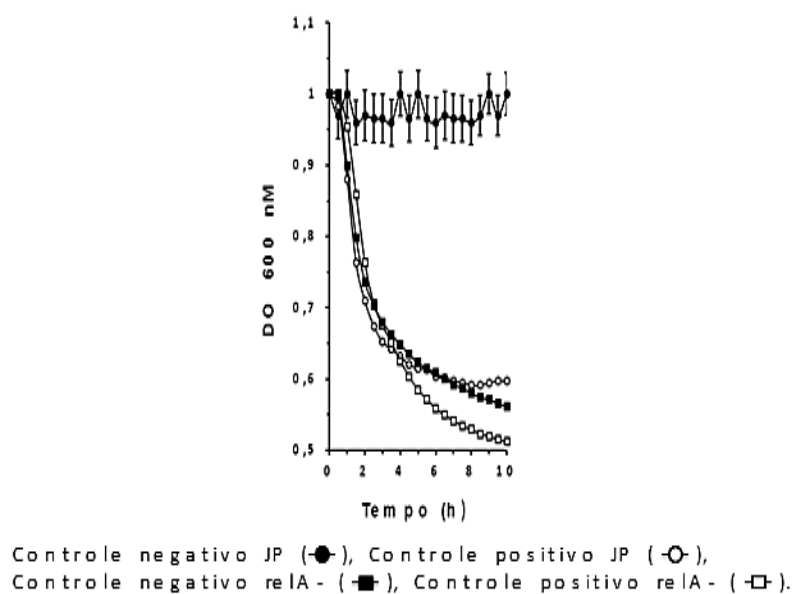


Figura 13. Curva de lise celular na presença de lisozima.

5.7 Crescimento em diferentes fontes de carbono

Em comparação a cepa parental de *L. vini*, o $\Delta relA$ demonstrou menor crescimento na presença de glicose, sacarose e maltose, não houve crescimento na presença de xilose e houve um expressivo crescimento quando celobiose foi a fonte de carbono (Figura 13).

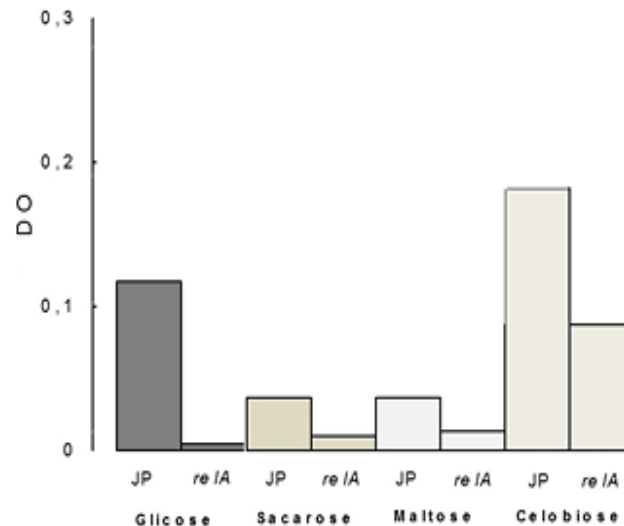


Figura 14. Perfil de assimilação de diferentes fontes de carbono de *L. vini* parental e $\Delta relA$

5.8 Presença de flagelo

A anotação do genoma feita pelo software Rast annotation revelou (Figura 14) a presença dos genes relacionados à síntese de flagelo (corpo, filamento, motor e reguladores). O que indica a presença de flagelo em *L. vini*, informação desconhecida até o presente momento.

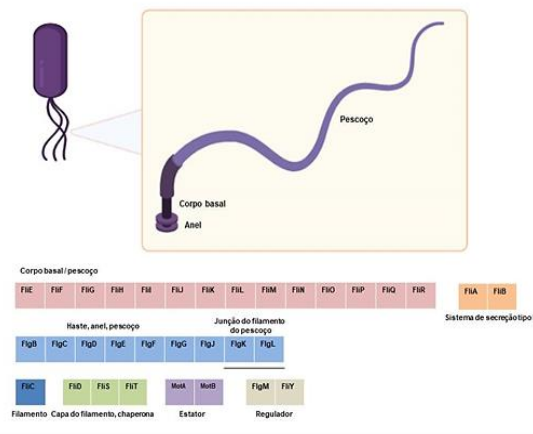


Figura 15. Genes responsáveis pela síntese de flagelo localizados no genoma de *L. vini*.

A microscopia de fluorescência identificou o flagelo de *L. vini* na cepa parental, mas não foi encontrado no mutante $\Delta relA$ (Figura 15).

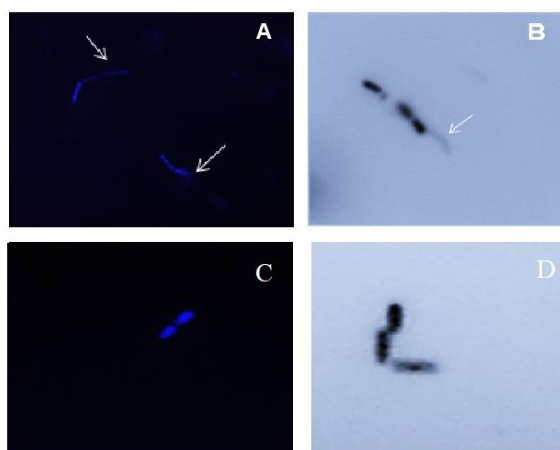


Figura 16. *Liquorilactobacillus vini* visto no microscópio de fluorescência. A) JP7.8.9 corado com Calcofluor White. B) JP7.8.9 corado com DAPI. C) $\Delta relA$ corado com Calcofluor white. D) $\Delta relA$ corado com DAPI.

5.9 Ensaio de motilidade

O mutante $\Delta relA$ apresentou menor motilidade em relação ao parental JP7.8.9 (Figura 16).

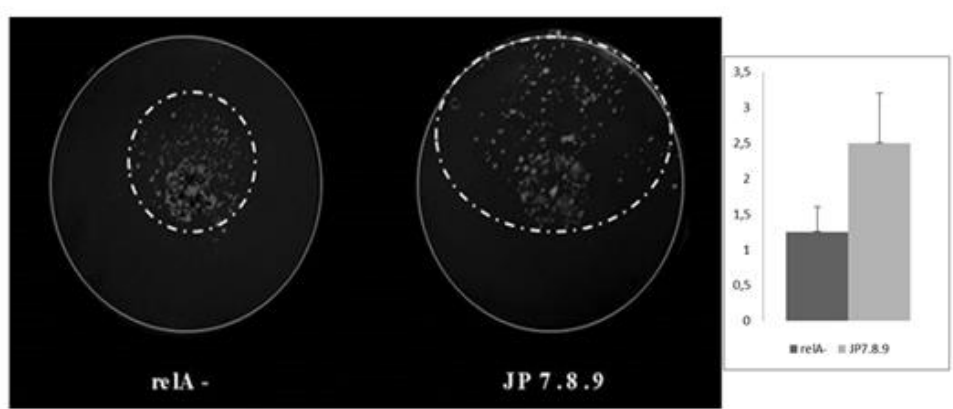


Figura 17. Ensaio de motilidade de *L. vini* $\Delta relA$ e JP7.8.9 em MRS-Ágar semi-sólido. Os halos estão medidos em centímetros.

6 DISCUSSÃO

A resposta estrigente é uma via regulatória conservada entre as bactérias de Gram positivas a Gram negativas (Eymann et al. 2002; Wolz; Geiger; Goerke, 2010). Mesmo sendo encontrada em várias bactérias com um mecanismo de funcionamento similar, produção do alarmônio (p)ppGpp, seu efeito na fisiologia bacteriana pode variar (Lemos et al. 2007). Inicialmente tida como uma resposta à privação nutricional (Traxler et al. 2008), atualmente há um conjunto de evidências que suportam essa via regulatória como parte da resposta a estresse em várias espécies (Eymann et al. 2002; Kasai et al. 2006; Papadimitriou et al. 2016).

A proteína RelA de *L. vini* é bifuncional (Figuras 6 e 7) e possui os domínios de síntese e degradação do alarmônio, além de conter uma pequena sintase e (p)ppGpp (figura 8). Em *L. vini* defectiva para o gene *relA* pode ocorrer a síntese de (p)ppGpp que se acumula, pois que a função de hidrólise da proteína RelA não está presente. Os efeitos do acúmulo de (p)ppGpp no metabolismo desencadeiam crescimento lento e segundo Yan et al, (2009), RelA é fundamental para a resposta ao estresse em *E.faecalis*.

O fenótipo da linhagem *L. vini* defectiva para gene *relA* contribui para o entendimento do funcionamento da resposta estrigente em bactérias lácticas. *L. vini* $\Delta relA$ apresentou um perfil de resposta ao estresse específico com maior MIC e MBC para NaCl e intervalo prolongado no crescimento exponencial na concentração sub-MIC (Figura 12). Em outros organismos como *Rhizobium etli* (Vercruysse et al. 2011) e *Enterococcus faecalis* (Abranches et al.2009), uma resposta estrigente defectiva levou a uma maior sensibilidade ao estresse osmótico. É importante salientar que a melhora da tolerância a estresse osmótico da linhagem defectiva para resposta estrigente é uma característica demonstrada apenas por *L. vini*. Nas demais espécies estudadas o observado é uma neutralidade do efeito da inativação do gene *relA* na tolerância a estresse ou uma maior sensibilização. É possível que o mutante possa acumular níveis mais altos de osmoprotetores, substâncias que podem ser acumuladas em altas concentrações sem prejuízo ao metabolismo celular (Beumer et al. 1994).

A ausência do gene *relA* não afetou o perfil de crescimento na presença de etanol nem a tolerância. Em *E.coli*, o estresse por etanol resulta na produção de (p)ppGpp (Horinouchi et al. 2015), provavelmente pela sintase RelA . (p)ppGpp liga-

se a numerosas enzimas celulares e é conhecido por inibir a atividade da enzima de síntese de fosfolipídios PlsB (Cao et al.2017).

A parede celular lábil de $\Delta relA$ (figura) pode ser explicada pela fase exponencial prolongada de crescimento. Foi observado por Gaca et al. (2013) que em *E. faecalis*, uma bactéria ácido láctica, a proteína RelA está relacionada a entrada na fase estacionária de crescimento e resposta ao estresse principalmente pela hidrólise de (p)ppGpp gerando energia. Em *L. vini*, a ausência da proteína bifuncional RelA impede a degradação de (p)ppGpp, o que ocasiona uma fase estacionária de crescimento tardia. Na fase exponencial de crescimento a parede celular precisa ser mais lábil para permitir o amplo fluxo de substâncias pela membrana plasmática.

O $\Delta relA$ foi sensibilizado pelos tratamentos nas concentrações sub-MIC testadas (figura), tornando-se mais tolerante apenas ao acetato quando previamente exposta a concentrações sub-MIC deste mesmo agente estressor. De acordo com Cayron e Lesterlin (2019), a exposição da bactéria ao agente estressor ativa os mecanismos de resposta ao estresse o que torna a célula mais eficiente em sobreviver a doses maiores subsequentes deste mesmo agente estressor.

Os dados sugerem que a ausência do gene *relA* em *L. vini* reduz a eficiência com que a célula lida com concentrações altas dos agentes estressores. O tratamento da linhagem mutante em condições sub-MIC induziu uma redução da MBC nos diferentes agentes estressores. Em destaque o tratamento com pH ácido, etanol e cloreto de sódio. Esses dados sugerem que mesmo em condições sub-MIC a linhagem mutante possa acumular danos ou tenha uma resposta celular deficiente ao ponto de comprometer a sua viabilidade celular em doses altas dos agentes estressores. Fenômeno que não se observa na linhagem parental quando submetida às mesmas condições de tratamento.

Em *L. vini*, o perfil de crescimento em diferentes fontes de carbono foi afetada pela interrupção do gene *relA* como visto na figura. A alteração do perfil de assimilação de carbono foi verificado por Gaca et al (2013) no mutante (p)ppGpp nulo de *Enterococcus faecalis*, mas não houve alteração para o $\Delta relA$, demonstrando que a resposta estrigente pode ser variável dentro do grupo das BAL. O $\Delta relA$ apresentou maior crescimento em celobiose, um dissacarídeo glicosil-glicose repetitivo da celulose, presente na parede celular de plantas como a cana-de-açúcar. Na natureza são poucas as bactérias que fermentam a celobiose e por

isso são construídos por meio da engenharia genética mutantes como *E.coli* (Sekar et al.2011) responsáveis pela degradação da celulose com finalidade biotecnológica. O crescimento elevado do mutante em celobiose pode indicar que $\Delta relA$ usa as fontes de carbono preferencialmente para o crescimento e replicação detrimento ao acúmulo de reserva energética.

A resposta a estresse em bactérias flageladas pode ser desencadeada pela recepção do estímulo e fuga para um local favorável, evitando danos celulares (Zhao et al. 2007). *L. vini* é uma bactéria flagelada e móvel (Figuras 15,16 e 17). A interrupção do gene *relA* pode ter afetado a motilidade de *L. vini*, o que demonstra o amplo papel do gene na fisiologia bacteriana. *E.coli* também é uma bactéria móvel e o trabalho de Åberg et al. (2009) a partir de dados de quimiotaxia e análise de expressão gênica verificou que a mutação do gene *relA* reduziu a motilidade da cepa, indicando que a cepa deficiente em ppGpp expressa, em comparação com a parental, menos flagelos, em contraposição ao mutante *dksa*, que houve aumento da motilidade.

7 CONCLUSÕES

Em *L. vini*, a ausência de uma cópia funcional do gene *relA* aumentou a sensibilidade aos principais estressores presentes na produção de etanol: lactato, acetato e etanol, além do pH baixo e elevou a tolerância a NaCl. Os resultados sugerem que o alarmônio exerce um papel especializado para os estresses lactato e acetato e uma resposta geral para HCl (pH) e etanol. Essa característica diverge de outros modelos bacterianos como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, que apresentam mecanismos de resposta diferentes de *L.vini*. A ausência do gene *relA* afetou também o crescimento da cepa em diferentes fontes de carbono, síntese da parede celular e a motilidade, o que ressalta a importância do alarmônio na sobrevivência celular. Nossos dados indicam, portanto, que o gene *relA* em *L. vini* tem um papel central na fisiologia indo além do esperado para um gene de resposta a estresse. Estudos posteriores são necessários para melhor entender o papel do gene *relA* em *L.vini* e explorar seu potencial biotecnológico.

REFERENCIAS

- BERGA. et al. Similar and Divergent Effects of ppGpp and DksA Deficiencies on Transcription in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3226–3236, 27 fev. 2009.
- ABRANCHES, J. et al. The Molecular Alarmone (p)ppGpp Mediates Stress Responses, Vancomycin Tolerance, and Virulence in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2248–2256, abr. 2009.
- ANDERSON, B. W. et al. Evolution of (p)ppGpp-HPRT regulation through diversification of an allosteric oligomeric interaction. **eLife**, v. 8, 25 set. 2019.
- AVILAN, L. et al. RSH enzyme diversity for (p)ppGpp metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* and other diatoms. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 27 nov. 2019.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.
- B J B WOOD; HOLZAPFEL, W. H. **The Lactic Acid Bacteria Volume 2, The genera of lactic acid bacteria**. London ; New York: Blackie Academic And Professional, 1995.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 54–66, jan. 2011.
- BARRE, P. Identification of *Thermobacteria* and Homofermentative, Thermophilic, Pentose-utilizing *Lactobacilli* from High Temperature Fermenting Grape Musts. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 44, n. 1, p. 125–129, fev. 1978.
- BATTESTI, A.; BOUVERET, E. Bacteria Possessing Two RelA/SpoT-Like Proteins Have Evolved a Specific Stringent Response Involving the Acyl Carrier Protein-SpoT Interaction. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 2, p. 616–624, 7 nov. 2008.
- BEIJERINCK M. ANHÄUFUNGSVERSUCHE MIT UREUMBAKTERIEN. Ureumspaltung durch urease und durch Katabolismus. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg II Abt**, v.7:33–61,1901.
- BERNARDEAU, M.; GUGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Beneficial *lactobacilli* in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 487–513, jul. 2006.
- BEUMER, R. R. et al. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1359–1363, abr. 1994.
- BIENERT, S. et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, 29 nov. 2016.
- BOOTH, I. R.; HIGGINS, C. F. Enteric bacteria and osmotic stress: Intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? **FEMS Microbiology Letters**, v. 75, n. 2-3, p. 239–246, jun. 1990.
- BROOIJMANS, R. et al. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, 29 maio 2009.

BROWN, A. et al. Ribosome-dependent activation of stringent control. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 277–280, 9 maio 2016.

CAO, H. et al. Systems-level understanding of ethanol-induced stresses and adaptation in *E. coli*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 16 mar. 2017.

CARNEIRO, S. et al. Stringent response of *Escherichia coli*: revisiting the bibliome using literature mining. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 1, n. 1, dez. 2011.

CARTWRIGHT, C. P. et al. Ethanol Dissipates the Proton-motive Force across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 369–377, 1 fev. 1986.

CAVALCANTE, L. S. **Obtenção de L-arabinose Isomerase por rota fermentativa e caracterização da enzima obtida visando a produção de D-Tagatose**. TCC—Universidade Federal do Ceará: [s.n.].

CAYLEY, S. et al. Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity: Implications for protein-DNA interactions in vivo. **Journal of Molecular Biology**, v. 222, n. 2, p. 281–300, 20 nov. 1991.

CAYRON, J.; LESTERLIN, C. Multi-scale Analysis of Bacterial Growth Under Stress Treatments. **Journal of Visualized Experiments**, n. 153, 28 nov. 2019.

CRAWFORD, E. W.; SHIMKETS, L. J. The *Myxococcus xanthus* *socE* and *csgA* genes are regulated by the stringent response. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 788–799, ago. 2000.

DA SILVA, P. K. N. et al. Nutritional requirements for *Lactobacillus vini* growth in sugarcane derivative substrate of ethanol fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 16, 1 ago. 2019.

DALEBROUX, Z. D. et al. ppGpp Conjures Bacterial Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 2, p. 171–199, jun. 2010.

DAS, B.; BHADRA, R. K. (p)ppGpp Metabolism and Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 9 out. 2020.

DUAR, R. M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. Supp_1, p. S27–S48, 30 jun. 2017.

DUWAT, P. et al. Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 15, p. 4509–4516, 1 ago. 2001.

EPSTEIN, W. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 39, n. 1-2, p. 73–78, jul. 1986.

EVEN, S. et al. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and

energetic constraints. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1143–1152, ago. 2002.

EYMAN, C. et al. *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 9, p. 2500–2520, maio 2002.

FASNACHT, M.; POLACEK, N. Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 10 maio 2021.

FERNÁNDEZ-COLL, L.; CASHEL, M. Possible Roles for Basal Levels of (p)ppGpp: Growth Efficiency Vs. Surviving Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 9 out. 2020.

GACA, A. O. et al. Basal Levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the Magic beyond the Stringent Response. **mBio**, v. 4, n. 5, nov. 2013.

GALINSKI, E. A.; TRÜPER, H. G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 95–108, out. 1994.

GENG, P.; ZHANG, L.; SHI, G. Y. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, 12 abr. 2017.

GONZAGUINHA. **Caminhos do coração**. Rio de Janeiro. EMI-Odeon Fonográfica, Industrial e Eletrônica Ltda. 1982. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=CaNMouX_QKg. Acesso em: 25/12/2021.

GUAN, N. et al. Metabolic engineering of acid resistance elements to improve acid resistance and propionic acid production of *Propionibacterium jensenii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 6, p. 1294–1304, 30 dez. 2015.

GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; COCCONCELLI, P. S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2255–2264, 1 ago. 2001.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, v. 2, p. 19–54, 1995.

HE, H. et al. Stringent Response Regulation of Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 2962–2972, 30 mar. 2012.

HORINOUCHI, T. et al. Phenotypic convergence in bacterial adaptive evolution to ethanol stress. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, 3 set. 2015.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1-3, p. 165–178, set. 1993.

IMLAY, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 755–776, jun. 2008.

IRVING, S. E.; CHOUDHURY, N. R.; CORRIGAN, R. M. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 256–271, 4 nov. 2020.

IRVING, S. E.; CORRIGAN, R. M. Triggering the stringent response: signals responsible for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. **Microbiology**, v. 164, n. 3, p. 268–276, 1 mar. 2018.

JAIN, P. et al. Evaluation on the responses of succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase to acid shock generated acid tolerance in *Escherichia coli*. **Advanced Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 75, 2013.

KARP, P. D. et al. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1085–1093, 17 ago. 2017.

KASAI, K. et al. Physiological Analysis of the Stringent Response Elicited in an Extreme Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 20, p. 7111–7122, out. 2006.

KATHARINA NOGUEIRA DA SILVA, P. **Avaliação do metabolismo de *Lactobacillus vini* em resposta à composição nutricional do meio**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)—Universidade Federal de Pernambuco: [s.n.].

LEMOS, J. A. et al. Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1568–1581, set. 2007.

LIU, Y. et al. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1484–1492, nov. 2015.

LUCENA, B. T. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, 23 nov. 2010.

LUCENA, B. T. et al. Genome Sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202 T and JP7.8.9. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 3018–3018, jun. 2012.

MALEKI, F. Bacterial Heat Shock Protein Activity. **Journal of Clinical And Diagnostic Research**, 2016.

MECHOLD, U.; MALKE, H. Characterization of the stringent and relaxed responses of *Streptococcus equisimilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2658–2667, abr. 1997.

MENDONÇA, A. A. et al. First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 3, p. fnv240, 30 dez. 2015.

MENDONÇA, A. A. et al. Gene regulation of the *Lactobacillus vini* in response to industrial stress in the fuel ethanol production. **Microbiological Research**, v. 236, p. 126450, jun. 2020.

MENDONÇA, A. A. et al. Lactobacillus vini: mechanistic response to stress by medium acidification. **Microbiology**, v. 165, n. 1, p. 26–36, 1 jan. 2019.

METZGER, S. et al. Protein Sequences Encoded by the relA and the spoT Genes of Escherichia coli Are Interrelated. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 16, p. 9122–9125, jun. 1989.

MIETHKE, M. et al. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in Bacillus subtilis. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1413–1427, set. 2006.

MOHAMADZADEH, M. et al. Dendritic cell targeting of Bacillus anthracis protective antigen expressed by Lactobacillus acidophilus protects mice from lethal challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 11, p. 4331–4336, 25 fev. 2009.

MURGA, M. L. F. et al. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of Lactobacillus acidophilus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 342–348, fev. 2000.

OCHI, K.; KANDALA, J. C.; FREESE, E. Initiation of Bacillus subtilis sporulation by the stringent response to partial amino acid deprivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 13, p. 6866–6875, jul. 1981.

PAL, R. R. et al. Functional Characterization of the Stringent Response Regulatory Gene *dksA* of Vibrio cholerae and Its Role in Modulation of Virulence Phenotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 20, p. 5638–5648, 15 out. 2012.
PAPADIMITRIOU, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 80, n. 3, p. 837–90, 2016.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNÜRERJ. Dekkera bruxellensis and Lactobacillus vini Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4354–4356, 4 maio 2007.

PÉREZ-GALLARDO, R. V. et al. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 8, p. 804–819, 7 out. 2013.

PLETNEV, P. et al. Survival Guide: Escherichia coli in the Stationary Phase. **Acta Naturae**, v. 7, n. 4, p. 22–33, 1 dez. 2015.

POTRYKUS, K.; CASHEL, M. (p)ppGpp: Still Magical? **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 35–51, out. 2008.

POTTER, S. C. et al. HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W200–W204, 14 jun. 2018.

PULSCHEN, A. A. et al. The stringent response plays a key role in Bacillus subtilis survival of fatty acid starvation. **Molecular Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 698–712, 16 dez. 2016.

REDDY, G. et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 22–34, jan. 2008.

REEVE, B. W. P.; REID, S. J. Glutamate and histidine improve both solvent yields and the acid tolerance response of *Clostridium beijerinckii* NCP 260. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1271–1281, 4 abr. 2016.

ROBINSON, V. L.; BUCKLER, D. R.; STOCK, A. M. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 8, p. 626–633, 1 ago. 2000.

RODAS, A. M. et al. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 513–517, 1 mar. 2006.

ROGHANIAN, M. et al. (p)ppGpp controls stringent factors by exploiting antagonistic allosteric coupling between catalytic domains. **Molecular Cell**, v. 81, n. 16, p. 3310–3322.e6, ago. 2021.

RUSSELL, J. B.; MUCK, R. E.; WEIMER, P. J. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 2, p. 183–197, fev. 2009.

SCHÄFER, H. et al. The alarmones (p)ppGpp are part of the heat shock response of *Bacillus subtilis*. **PLOS Genetics**, v. 16, n. 3, p. e1008275, 16 mar. 2020.

SEKAR, R.; SHIN, H.-D.; CHEN, R. Engineering *Escherichia coli* Cells for Cellobiose Assimilation through a Phosphorolytic Mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1611–1614, 22 dez. 2011.

SENOUCI-REZKALLAH, K.; SCHMITT, P.; JOBIN, M. P. Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 364–372, maio 2011.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401–408, 1 out. 2004.

SLEATOR, R. D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 49–71, mar. 2002.

SOUZA, R. B. et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1645–1650, 1 nov. 2012.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-Component Signal Transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 183–215, jun. 2000.

STRUGEON, E. et al. The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. **mBio**, v. 7, n. 4, 7 set. 2016.

SUN, D. et al. A metazoan ortholog of SpoT hydrolyzes ppGpp and functions in starvation responses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 10, p. 1188–1194, 5 set. 2010.

SUN, Y. et al. Respiration and the F₁F_o-ATPase Enhance Survival under Acidic Conditions in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52577, 28 dez. 2012.

SUN, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 29 set. 2015.

TAKAHASHI, K.; KASAI, K.; OCHI, K. Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 12, p. 4320–4324, 9 mar. 2004.

TAKENAKA, S.; KAWASHIMA, T.; ARITA, M. A sugar utilization phenotype contributes to the formation of genetic exchange communities in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 17, 1 set. 2021.

TRAXLER, M. F. et al. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1128–1148, jun. 2008.

TRČEK, J.; MIRA, N. P.; JARBOE, L. R. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6215–29, 2015.

VAN BOKHORST-VAN DE VEEN, H. et al. Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5247–5256, ago. 2011.

VERCRUYSSSE, M. et al. Stress response regulators identified through genome-wide transcriptome analysis of the (p)ppGpp-dependent response in *Rhizobium etli*. **Genome Biology**, v. 12, n. 2, p. R17, 2011.

WINSTEDT, L. et al. *Enterococcus faecalis* V583 Contains a Cytochrome bd-Type Respiratory Oxidase. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3863–3866, 1 jul. 2000.

WOLZ, C.; GEIGER, T.; GOERKE, C. The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2-3, p. 142–147, fev. 2010.

WU, J.; LONG, Q.; XIE, J. (p)ppGpp and drug resistance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 2, p. 300–304, 21 abr. 2010.

XIAO, H. et al. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 9, p. 5980–5990, mar. 1991.

YAMAMOTO, Y. et al. Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 525–534, 22 fev. 2005.

YAMAMOTO, Y. et al. Roles of Environmental Heme, and Menaquinone, in Streptococcus Agalactiae. **BioMetals**, v. 19, n. 2, p. 205–210, abr. 2006.

YAN, X. et al. The (p)ppGpp synthetase RelA contributes to stress adaptation and virulence in Enterococcus faecalis V583. **Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 3226–3237, 16 jul. 2009.

YANCEY, P. et al. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, n. 4566, p. 1214–1222, 24 set. 1982.

YURA, T.; NAGAI, H.; MORI, H. Regulation of the Heat-Shock Response in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 321–350, out. 1993.

ZHAO, K.; LIU, M.; BURGESS, R. R. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to “foraging”-like behavior in E. coli. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 13, p. 4441–4452, 18 jun. 2007.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 1 abr. 2020.



Dayane da Silva Santos

Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/0456504242112576>

Última atualização do currículo em 04/01/2023

Resumo informado pelo autor

Graduada em Ciências Biológicas com láurea acadêmica pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2019) . Mestre e Doutoranda em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco.Foi membro do grupo de pesquisa Bioteclácteos da UFRPE (2016-2019) atuando no estudo de Bactérias ácido lácticas com potencial probiótico. Atua no Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM) da UFPE com enfoque em resposta ao estresse bacteriano.Possui experiência em Bioquímica de microrganismos, Biotecnologia,Microbiologia aplicada e Genética Molecular.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Dayane da Silva Santos

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas	SANTOS, D. S.;SANTOS, DAYANE DA SILVA
Sexo	Feminino
Cor ou Raça	Branca
Filiação	Edvaldo Alexandre da Silva e Josina Mariene da Silva Santos
Nascimento	08/06/1997 - São Lourenço da Mata/PE - Brasil
Carteira de Identidade	9249448 SDS - PE - 11/07/2011
CPF	117.052.884-80
Endereço residencial	Avenida Oriental,04 Penedo - São Lourenço da Mata 54715655, PE - Brasil Telefone: 81 35255135 Celular 81 999538304
Endereço profissional	Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética Universidade Federal de Pernambuco UF/PE Iputinga - Recife 50670901, PE - Brasil Telefone: 81 21268000
Endereço eletrônico	E-mail para contato : dayane.santos@ufpe.br E-mail alternativo santos.dhay08@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2022	Doutorado em Genética. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: Identificação da função biológica do gene relA em Liquorilactobacillus vini  Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior Co-orientador: Allyson Mendonça Andrade Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
2020 - 2022	Mestrado em Genética (Conceito CAPES 4). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: Perfil fenotípico de resposta ao estresse em linhagens de Liquorilactobacillus vini defectivas para o gene relA, Ano de obtenção: 2022  Orientador: Marcos Antônio de Moraes Junior Co-orientador: Allyson Andrade Mendonça Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2015 - 2019	Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
2012 - 2014	Ensino Médio (2o grau) . EREM Conde Pereira Carneiro, EREM%20CPC, Brasil, Ano de obtenção: 2014

Formação complementar

2021 - 2021	Curso de curta duração em PCR quantitativa em tempo real como ferramenta para avaliar expressão Gên. (Carga horária: 6h). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
2020 - 2020	Curso de curta duração em Auxiliar de fiscalização ambiental. (Carga horária: 160h). Colégio Agrícola Dom Agostinho Ikas, CODAI-UFRPE, Brasil

- 2020 - 2020

Curso de curta duração em Soluções Biotecnológicas aplicadas a ações de enfrentamento da COVID-19. (Carga horária: 90h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2020 - 2020

Curso de curta duração em Encapsulamento de Bioativos para Biocontrole. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2019 - 2019

Extensão universitária em INTRODUÇÃO À INFORMÁTICA. (Carga horária: 10h).
Universidade ABERTA integrada DE MINAS GERAIS, UAIMG, Brasil
- 2019 - 2019

Curso de curta duração em Elaboração de Revisão Sistemática e Metanálise. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2016 - 2016

Curso de curta duração em Leitura e produção de textos acadêmicos. (Carga horária: 68h).
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz Das Almas, Brasil
- 2016 - 2016

Curso de curta duração em Espanhol Básico. (Carga horária: 90h).
Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Petrolina, Brasil
- 2016 - 2016

Curso de curta duração em Introdução à Biotecnologia.. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2015 - 2015

Curso de curta duração em TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA ANÁLISES DE CIANOBACTÉRIAS. (Carga horária: 12h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2013 - 2014

Curso de curta duração em Inglês-Nível Básico II. (Carga horária: 54h).
Programa Ganhe o mundo, PGM, Brasil
- 2013 - 2014

Curso de curta duração em Inglês-Nível Pré-Intermediário II. (Carga horária: 54h).
Programa Ganhe o mundo, PGM, Brasil
- 2013 - 2014

Curso de curta duração em Inglês-Nível Básico I. (Carga horária: 54h).
Programa Ganhe o mundo, PGM, Brasil
- 2013 - 2014

Curso de curta duração em Inglês-Nível Pré -Intermediário I. (Carga horária: 54h).
Programa Ganhe o mundo, PGM, Brasil
- 2013 - 2014

Curso de curta duração em Inglês-Nível iniciante. (Carga horária: 54h).
Programa Ganhe o mundo, PGM, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Vínculo institucional

- 2016 - 2019

Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica Voluntária , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

- 08/2018 - 03/2020

Estágio, Centro de Apoio à Pesquisa

Estágio:
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA -PIC
- 03/2018 - 03/2018

Outra atividade técnico-científica, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Especificação:
V SIMPÓSIO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL-Monitor
- 10/2017 - 10/2017

Outra atividade técnico-científica, Conselho de Ensino a Pesquisa e Extensão

Especificação:
XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE-MONITOR
- 08/2017 - 09/2020

Estágio, Centro de Apoio à Pesquisa

Estágio:
Programa de Iniciação Científica - PIC UFRPE
- 10/2016 - 10/2016

Outra atividade técnico-científica, Conselho de Ensino a Pesquisa e Extensão

Especificação:
XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE-MONITOR
- 01/2016 - 01/2017

Estágio, Centro de Apoio à Pesquisa

Estágio:
Iniciação científica voluntária no Centro de Apoio a Pesquisa - CENAPESQ, vinculada ao Programa de Atividades a Vivência Interdisciplinar da Universidade Federal Rural de Pernambuco - PAVI/UFRPE.

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2020 - Atual

Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

- 03/2020 - Atual

Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

Especificação:
Bolsista

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2020 - Atual

Efeito de uma resposta estrigente defectiva em Lactobacillus vini sobre a resposta ao estresse e

	assimilação de fontes de carbono
	Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (3); Integrantes: Dayane da Silva Santos; ALLYSON ANDRADE MENDONÇA; CAROLINA ELZTEIN; MARCOS ANTÔNIO DE MORAIS JÚNIOR (Responsável)
2017 - 2021	Caracterização e potencial de bactérias ácido lácticas como probiótico isoladas do queijo de Coalho sobre o desenvolvimento de câncer colorretal
	Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (3); Integrantes: Dayane da Silva Santos; Priscilla Régia de Andrade Calaça; Ana Lúcia Figueiredo Porto; Maria Taciana Holanda Cavalcanti (Responsável); PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA; MEIRE SANTOS FALCÃO LIMA; ELAINE CRISTINA DA SILVA; KAROLINE MIRELLA SOARES DE SOUZA; ANA CAROLINE CAITANO DO NASCIMENTO
Projeto de extensão	
2020 - 2020	METODOLOGIAS REMOTAS COMO FORMA DE ACESSIBILIDADE À INFORMAÇÃO SOBRE A COVID-19 PARA A POPULAÇÃO GERAL: A CIÊNCIA PODE VIRALIZAR, O VÍRUS NÃO
	Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Dayane da Silva Santos; Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Responsável); Priscilla Régia de Andrade Calaça; Ana Lúcia Figueiredo Porto; ELAINE CRISTINA DA SILVA
Outros tipos de projetos	
2018 - 2019	Identificação do polimorfismo de Enterococcus faecium com potencial probiótico isoladas de queijo de Coalho
	Situação: Concluído Natureza: Outros tipos de projetos Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1); Integrantes: Dayane da Silva Santos; Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Responsável); Priscilla Régia de Andrade Calaça; PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA; Nara Suzy Aguiar de Freitas
2017 - 2018	Caracterização Parcial Probiótica e Molecular de Bactérias Ácido Lácticas Isoladas de Queijo de Coalho da Cidade De Arcoverde – Pernambuco.
	Situação: Concluído Natureza: Outros tipos de projetos Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1); Integrantes: Dayane da Silva Santos; Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Responsável); Priscilla Régia de Andrade Calaça
2016 - 2017	Caracterização parcial probiótica de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho.
	Situação: Concluído Natureza: Outros tipos de projetos Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Integrantes: Dayane da Silva Santos; Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Responsável); Priscilla Régia de Andrade Calaça

Revisor de periódico

1. RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR

Vínculo	
2021 - Atual	Regime: Parcial

Áreas de atuação

1.

Bioquímica
2.

Biotecnologia
3.

Genética Molecular e de Microorganismos

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
Espanhol	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2019	Laurea acadêmica de graduação, Universidade Federal Rural de Pernambuco
2012	Prêmio Aluno nota 10, Secretaria Municipal de Educação

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.

doi

BRITO, L. P.; **SANTOS, D. S.**; Freitas NSA; MEDEIROS, R. S.; Souza ,P.R.E; SOARES, M. T. C. V.; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO
In silico evaluation of genomic characteristics of Streptococcus infantarius subsp. infantarius for application in fermentations. ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS.

JCR

, v.94, p.1 - , 2022.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital

2.

doi

Aragão, A.B.L; SILVA, J. F.; SILVA, P. H.; SOUZA, P. H. S.; **SANTOS, D. S.**; SILVA, E.C; CALACA, P. R. A.; SILVA, E. C. S.; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO; SOARES, M. T. C. V.
EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CâNCER COLORRETAL: UMA ANÁLISE

3. CALACA, P. R. A.; **SANTOS, D. S.**; SILVA, J. F.; Aragão, A.B.L; MELO, I. M. F.; SILVA, E. C. S.; PORTO, A. L. F.; SOARES, M. T. C. V.
Enterococcus faecium 137v como fator de proteção em modelo animal para câncer colorretal. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. , v.10, p.1 - , 2021.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital
4.  CALAÇA, PRISCILLA RÉGIA DE ANDRADE; SILVA, E.C; Melo, FP; **SANTOS, D. S.**; Aragão, A.B.L; Silva, P.E.C.; BARROS, M. R.; PORTO, A. L. F.; Cavalcanti, M.T.H.
Enterococcus faecium EF137V: uma nova fonte estratégica para o controle da saúde humana e animal contra espécies de Campylobacter. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. , v.9, p.1 - , 2020.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital
5.   **SANTOS, DAYANE DA SILVA**; CALAÇA, PRISCILLA RÉGIA DE ANDRADE; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO; DE SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO; DE FREITAS, NARA SUZY AGUIAR; CAVALCANTI VIEIRA SOARES, MARIA TACIANA
What Differentiates Probiotic from Pathogenic Bacteria? The Genetic Mobility of *Enterococcus faecium* Offers New Molecular Insights. OMICS: A Journal of Integrative Biology.  , v.24, p.1 - , 2020.
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1089/omi.2020.0078]
6.   **SANTOS, DAYANE DA SILVA**; CALAÇA, PRISCILLA RÉGIA DE ANDRADE; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO; SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE; CAVALCANTI, MARIA TACIANA
HOLANDA
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL PROBIÓTICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO DA CIDADE DE ARCOVERDE - PERNAMBUCO. Iniciação Científica (CESUMAR). , v.21, p.7 - 14, 2019.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital

Artigos aceitos para publicação

1.  MENDONÇA, A.A; PINTO NETO, W. P.; PAIXAO, G. A.; **SANTOS, D. S.**; SOUZA, R. B.; MORAIS JUNIOR, M. A
Journey of the Probiotic Bacteria: Survival of the Fittest. Microorganisms.  , 2023.
Referências adicionais: Inglês.

Capítulos de livros publicados

1.  SANTOS, D. S.; LUNA ,B.I.C.; Simas, J.H.O.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.; Santos,C. N. P.
A diversão é um lixo In: Crise Eco(lógica).1 ed.RECIFE: EDUFRPE, 2018, p. 22-23.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso, ISBN: 5000000000000

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SANTOS, D. S.; Simas, J.H.O.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.; MELO, M.L.Q.; ARAUJO, V. F. D. S.; ALMEIDA, A. V.
. Classe Amphibia: uma análise das diversas abordagens em livros didáticos do ensino médio. In: XVIII JORNADA DE ENSINO. PESQUISA E EXTENSÃO (JEPEX-UFRPE), 2018, RECIFE.
XVIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. , 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
2. Simas, J.H.O.; SANTOS, D. S.; ARAUJO, V. F. D. S.; MELO, M.L.Q.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.; ALMEIDA, A. V.
Análise dos filmes 'Rio 2' e 'A princesa e o sapo' como recursos didáticos no ensino da classe Amphibia In: XVIII JORNADA DE ENSINO. PESQUISA E EXTENSÃO (JEPEX-UFRPE), 2018, RECIFE.
XVIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. , 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
3. SANTOS, D. S.; Cavalcanti, M.T.H.; CALACA, P. R. A.
CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DA CIDADE DE ARCOVERDE-PE In: XVIII JORNADA DE ENSINO. PESQUISA E EXTENSÃO (JEPEX-UFRPE), 2018, RECIIFE.
XVIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. , 2018.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
4. Simas, J.H.O.; SANTOS, D. S.; Santos,C. N. P.; MELO, M.L.Q.; Santos, E.M.
Anatomia e fisiologia humana nos volumes das revistas Nova Escola e Ciência Hoje das Crianças:possibilidades pedagógicas In: XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2017, Recife-PE.
XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE. , 2017.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
5. Aragão, A.B.L; SANTOS, D. S.; Silva, P.E.C.; CALACA, P. R. A.; PORTO, A. L. F.; SOARES, M. T. C. V.
Efeito antimicrobiano sobre Listeria innocua ATCC 33090 a partir de bacteriocina produzida por bactéria ácido láctica In: XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2017, Recife-PE.
XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE. , 2017.
Palavras-chave: bacteriocinas, Bactérias ácido lácticas, Antimicrobiana, Pré-purificação
Áreas do conhecimento: Bioquímica,Biotecnologia
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
6. SANTOS, D. S.; Aragão, A.B.L; CALACA, P. R. A.; PORTO, A. L. F.; SOARES, M. T. C. V.
Perfil antagonista da simbiose entre uma bactéria ácido láctica com potencial probiótico e o Bacillus clausii In: XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2017, Recife-PE.
XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE. , 2017.
Palavras-chave: Atividade antagonista, Probióticos, Relações simbióticas, Tecnologia dos alimentos
Áreas do conhecimento: Bioquímica,Biotecnologia
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
7.  CALACA, P. R. A.; SANTOS, D. S.; PORTO, A. L. F.; Cavalcanti, M.T.H.
Avaliação Parcial in Vitro de Características Probioticas das Bactérias Ácido Lacticas Isoladas do Queijo de Coalho In: VI Congresso Luso Brasileiro de Patologia Experimental, Garanhuns-PE.
Novos Paradigmas no Estudo das Doenças: Contribuições da Neurociência. , 2016.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
8.  SANTOS, D. S.; Santos,C. N. P.; SANTOS, A. M. F. D.; Guimarães, D. C.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.
Dispersão: estado da arte e reflexão acerca das consequências da degradação ambiental In: XVI Jornada de Ensino,Pesquisa e Extensão. JEPEX UFRPE, 2016, Recife.
Inovação Tecnológica em ensino, pesquisa e extensão.. , 2016.
Palavras-chave: Dispersão e degradação ambiental, Dispersão em florestas neotropicais
Áreas do conhecimento: Ecologia
Referências adicionais: Brasil/Português.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SANTOS, D. S.**; MENDONÇA, A.A; MORAIS JUNIOR, M. A
Identificação da função biológica do gene relA em Liquorilactobacillus vini, 2022.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: UFPE; Cidade: Recife; Evento: XII Jornada da Pós-graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: UFPE
2. **SANTOS, D. S.**; MENDONÇA, A.A; ELZTEIN, C.; MORAIS JUNIOR, M. A
Efeito de uma resposta estrigente defectiva de Lactobacillus vini na resposta ao estresse e assimilação de fontes de carbono, 2020. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: UFPE; Cidade: Recife; Evento: X Jornada de Pós Graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: UFPE

3.

SANTOS, D. S.; CALACA, P. R. A.; SOARES, M. T. C. V.

CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DA CIDADE DE ARCOVERDE-PE, 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: UFRPE; Cidade: RECIFE; Evento: XVII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO; Inst.promotora/financiadora: UFRPE
4.

SANTOS, D. S.; Simas, J.H.O.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.; MELO, M.L.Q.; ARAUJO, V. F. D. S.; ALMEIDA, A. V.

Classe Amphibia: uma análise das diversas abordagens em livros didáticos do ensino médio., 2018. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: UFRPE; Cidade: RECIFE; Evento: XVIII JORNADA DE ENSINO,PESQUISA E EXTENSÃO; Inst.promotora/financiadora: UFRPE
5.

SANTOS, D. S.; Aragão, A.B.L; CALACA, P. R. A.; SOARES, M. T. C. V.

Perfil antagonista da simbiose entre uma bactéria ácido láctica com potencial probiótico e o Bacillus clausii., 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: UFRPE; Cidade: RECIFE; Evento: XVII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO; Inst.promotora/financiadora: UFRPE
6.

SANTOS, D. S.; Santos,C. N. P.; SANTOS, A. M. F. D.; Guimarães, D. C.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.

Dispersão: estado da arte e reflexão acerca das consequências da degradação ambiental, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: UFRPE; Cidade: RECIFE; Evento: XVI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO; Inst.promotora/financiadora: UFRPE

Produção técnica

Demais produções técnicas

1.

SANTOS, D. S.; Simas, J.H.O.; MELO, M.L.Q.; LUNA ,B.I.C.

Verticilos reprodutores florais, 2017. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Áreas do conhecimento: Botânica,Métodos e Técnicas de Ensino

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro
2.

SANTOS, D. S.; SANTOS, A. M. F. D.; ALBUQUERQUE, J. C. R. D.; ARAUJO, V. F. D. S.; Santos,C. N. P.; Guimarães, D. C.

JOGO EVOLUTION:ESTUDO DOS MEMBROS ANTERIORES DOS MAMÍFEROS, 2016. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Palavras-chave: Anatomia Comparada, Evolução

Áreas do conhecimento: Anatomia Humana,Evolução,Anatomia Animal

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

Educação e Popularização de C&T

Artigos completos publicados em periódicos

1.

Aragão, A.B.L; SILVA, J. F.; SILVA, P. H.; SOUZA, P. H. S.; **SANTOS, D. S.**; SILVA, E.C; CALACA, P. R. A.; SILVA, E. C. S.; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO; SOARES, M. T. C. V.

EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL: UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL. RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218. , v.2, p.e25318 - , 2021.

Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1.



Larissa Almeida da Silva. **Perfis genômicos do transposon TN4401 de isolados de Proteus sp., Providencia sp. e Morganella sp.**, 2022. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Referências adicionais: Brasil/Português.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1.

III Simpósio de Genética do Delta do Parnaíba, 2020. (Simpósio)

.
2.

Avaliador no(a) **Semana Universitária UPE 2020**, 2020. (Congresso)

Avaliação de trabalhos de iniciação científica.
3.

Simpósio Complexo Hospitalar 2020, 2020. (Simpósio)

.
4.

Avaliador no(a) **V MOCICA**, 2020. (Congresso)

Avaliação de trabalhos de iniciação científica.
5.

Ensino de Biologia por Investigação., 2018. (Oficina)

.
6.

O Teatro no Ensino de Ciências, 2018. (Oficina)

.
7.

O cuidar de si na docência: O bem-estar no ensino de biologia, 2018. (Oficina)

.

8.

Tendências Pedagógicas no Ensino de Biologia, 2018. (Oficina)
9.

Apresentação de Poster / Painel no(a) XVIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2018. (Congresso)
CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DA CIDADE DE ARCOVERDE-PE.
10.

Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2017. (Simpósio)
11.

Apresentação de Poster / Painel no(a) XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2017. (Congresso)
Perfil antagonista da simbiose entre uma bactéria ácido láctica com potencial probiótico e o Bacillus clausii.
12.

Palestra-Enfrentamento de doenças parasitárias negligenciadas em Pernambuco em, 2016. (Outra)
13.

VII mostra Lecbio, 2016. (Exposição)
14.

Apresentação de Poster / Painel no(a) XVI Jornada de Ensino, Pesquisa e extensão. JEPEX UFRPE, 2016. (Congresso)
Dispersão:estado da arte e reflexão acerca das consequências da degradação ambiental.
15.

Palestra-O Biólogo e sua indispensável contribuição no âmbito da Perícia Criminal, 2015. (Outra)
16.

XII SEMANA DE BIOLOGIA DA UFRPE, 2015. (Outra)

Organização de evento

1.

SANTOS, D. S.
I BIOMELPE, 2022. (Congresso, Organização de evento)
Referências adicionais: Brasil/Português.

Bancas

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1.

Semana Universitária 2020, 2020
Universidade de Pernambuco
Referências adicionais: Brasil/Português.
2.

V Mostra Científica do Cariri, 2020
V Mostra Científica do Cariri
Referências adicionais: Brasil/Português.

Citações

R Web of Science		
Total de trabalhos: 5	Total de citações: 7	Fator H: 1
Dayane da Silva Santos		

SciELO		
Total de trabalhos: 5	Total de citações: 7	
Santos, Dayane da Silva		

Outras		
Total de trabalhos: 5	Total de citações: 4	
Dayane da Silva Santos		

Totais de produção

Produção bibliográfica	
Artigos completos publicados em periódico	6
Artigos aceitos para publicação	1
Capítulos de livros publicados	1
Trabalhos publicados em anais de eventos	8
Apresentações de trabalhos (Congresso)	5
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

Produção técnica	
Desenvolvimento de material didático ou instrucional	2

Orientações	
-------------	--

Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação)	1
Eventos	
Participações em eventos (congresso)	5
Participações em eventos (simpósio)	3
Participações em eventos (oficina)	4
Participações em eventos (outra)	3
Organização de evento (congresso)	1
Participação em banca de comissões julgadoras (outra)	2